IMPERIAL MYCOLOGICAL
26 OCT 1937
INSTITUTE

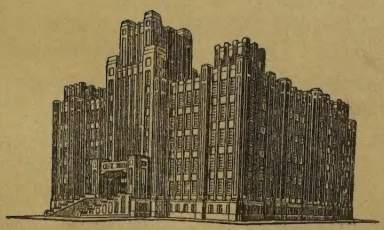
Vol. 7

1936

ARCHIVOS

DO

INSTITUTO BIOLOGICO



SECRETARIA DA AGRICULTURA

SÃO PAULO

BRASIL

SUMMARIO

Pags.

1. **A. A. Bitancourt** — SOBRE CHAETOTHYRIUM GUARANITICUM SPEG. E CHAETOTHYRINA MUSARUM (SPEG.) THEISSEN — Com 2 figuras no texto e estampas 1-2 5-22
2. **A. E. Jenkins** — COMPARAÇÕES CULTURAES E INOCULAÇÕES EM VIDEIRA COM OS FUNGOS "ELSINOE FAWCETTI", "E. AMPELINA" E "E. VENETA" — Com 9 figuras no texto e estampas 3-5 23-32
3. **K. Silberschmidt** — A IMPORTANCIA DA "ESPECIE" NO SYSTEMA DAS PLANTAS E A TENTATIVA DA SUA DELIMITAÇÃO POR NOVOS METHODOS — Com 3 figuras no texto e estampas 6-7 33-50
4. **P. R. de Souza** — ALGUNS DETALHES SOBRE A COLORAÇÃO DE CÓRTES HISTOLOGICOS COM A SOLUÇÃO AZUR-AZUL-EOSINA DE MEYER 51-54
5. **O. Bier** — SOBRE A QUESTÃO DA CONVERSIBILIDADE DOS ESTREPTOCOCCOS ENVERDESCENTES EM HEMOLYTICOS — Estampa 8 55-60
6. **P. Nobrega** — AMOSTRAS ATYPICAS DE "SALMONELLA PULLORUM" 61-64
7. **Dr. Stillman Wright** — RELATORIO SOBRE UMA INVESTIGAÇÃO PRELIMINAR — "LIMNOLOGIA DAS AGUAS DE S. PAULO" 65-73
8. **R. von Ihering e P. de Azevedo** — AS PIÁBAS DOS AÇUDES NORDESTINOS *(Characidae, Tetragonopterinae)* — Com 2 figuras no texto e estampas 9-12 75-106
9. **R. von Ihering e P. de Azevedo** — A DESOVA E A HYPOPHYSAÇÃO DOS PEIXES. EVOLUÇÃO DE DOIS NEMATOGNATHAS — Estampas 13-14 107-118
10. **J. R. Meyer e J. Saborido** — NOVO ADENOCARCINOMA TRANSPLANTAVEL DO CAMONDONGO — Estampas 15-20 119-124
11. **K. Silberschmidt e M. Kramer** — SOBRE SUBSTANCIAS VEGETAES QUE ESTIMULAM O ALONGAMENTO E A DIVISÃO DAS CELLULAS — Estampas 21-23. 125-156
12. **J. P. da Fonseca** — CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DOS MEMBRACIDEOS NEOTROPICOS — Com 25 figuras no texto. 157-166
13. **V. L. Yakimoff** — COCCIDIOS DOS ANIMAES DOMESTICOS DO BRASIL 167-187
14. **V. L. Yakimoff e V. F. Gussieff** — ISOSPORA ROCHA-LIMAI n. sp. — PARASITA DA PÊGA (PICA PICA L.) — Estampa 24 189-190
15. **J. Saborido** — ACÇÃO ANTIRACHITICA DO OLEO DE CAPIVARA E DE DIVERSOS OLEOS VEGETAES — (VERIFICAÇÃO ANATOMO-PATHOLOGICA) — Estampas 25-29 191-202

CONTINÚA NO VERSO)

Pags.

16. **E. Marcus** — SOBRE ALGUNS PHENOMENOS DA VIDA DOS BRYOZOARIOS MARINHOS — Com 7 figuras no texto 203-208

17. **C. Pereira, M. Vianna Dias e P. de Azevedo** — BIOLOGIA DO NEMATOIDE "PROCAMALLANUS CEARENSIS" n. sp. — Com 8 figuras no texto e estampas 30-33 209-226

18. **C. Rodrigues** — O ISOLAMENTO DE ANAEROBIOS EM PLACAS. MODIFICAÇÕES DO PROCESSO FORTNER — Com 1 figura no texto 227-233

19. **C. Rodrigues** — ESTUDOS SOBRE O "CLOSTRIDIUM CHAUVOEI" — VARIAÇÕES NA MORPHOLOGIA DAS COLONIAS — Com 1 figura no texto e estampas 34-40 235-244

20. **C. Pereira** — NOTA SOBRE A ACANTHELLA DE "ONCICOLA ONCICOLA" (v. IHERING, 1892) — Com 3 figuras no texto e estampas 41-42 245-252

21. **Z. Vaz** — ESTUDOS SOBRE NEMATOIDES PARASITAS DA EMA ("RHEA AMERICANA") — Com 20 figuras no texto 253-266

22. **Z. Vaz** — HEMPELIA HEMPELI n. g. n. sp. DE NEMATOIDE ESPIRURIDEO PARASITA DOS OLHOS DA PERDIZ E CODORNA — *(Rhynchotus rufescens e Nothura maculosa)* — Com 5 figuras no texto 267-271

23. **V. Carneiro** — AS EPIZOOTIAS DE RAIVA NA AMERICA E O PAPEL DOS MORCEGOS HEMATÓPHAGOS — Com 1 figura no texto 273-322

SOBRE CHAETOTHYRIUM GUARANITICUM SPEG. E CHAETOTHYRINA MUSARUM (SPEG.) THEISSEN

POR

A. A. Bitancourt

Trabalho do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 2 figuras no texto e estampas 1-2

A FULIGEM DA BANANA E SEU AGENTE

Sob o nome de «fuligem» (em inglez *sooty blotch)* designa-se um leve revestimento escuro, na superficie das plantas, constituido pelo mycelio superficial de um fungo.

A fuligem da banana é commum no Brasil meridional, onde é principalmente encontrada na variedade «prata» (Est. 2, fig. B). A occorrencia da fuligem na banana prata é tão frequente, — ao passo que essa doença é praticamente ausente na maioria das outras variedades, — que, nos mercados, a banana prata distingue-se, á distancia, das demais, somente pela presença desse revestimento fuligineo.

Observei egualmente a fuligem em abundancia nas fructas de uma plantação da variedade «figo», em Ubatuba. A doença é muito mais rara na variedade «maçã». Estas duas variedades, assim como a «prata», pertencem á especie *Musa sapientum* L. Nunca observei a fuligem na banana nanica *(Musa cavendishii* LAMB.), a especie que mais exportamos para os paizes estrangeiros, e nem nas outras variedades de bananas commumente encontradas em São Paulo. Veremos adeante como é possivel explicar essas differenças.

Um exame da «fuligem» da banana ao microscopio revela que esse revestimento é produzido por um mycelio superficial e por fructificações ou conceptaculos arredondados, em forma de um escudo achatado, intimamente adaptados ao substrato, e esparsos na superficie da mancha de fuligem. Estes conceptaculos pertencem a um fungo que foi descripto por SPEGAZZINI (P. A. SACCARDO 3: Vol. 16, pag. 636) em 1899, sob o nome de *Chaetothyrium musarum.*

O genero *Chaetothyrium* fôra criado annos antes pelo mesmo autor (3, vol. 9, pag. 1.061) para um fungo, *Ch. guaraniticum,* encontrado numa folha de planta indeterminada. Caracterisou elle o novo genero pelos seus conceptaculos, que descreveu como perithecios superficiaes, com paredes reduzidas a um simples escudo: «*perithecia scutato-dimidiata*», o que obrigava, de accordo com a nomenclatura em vigor naquella epoca, a incluil-o na familia das Microthyriaceas.

A presença dos pêlos na superficie da parede dos conceptaculos distinguia o novo genero dos demais membros da mesma familia.

O genero *Chaetothyrium* foi removido por THEISSEN (5) para as Hypocreaceas e mais tarde, por THEISSEN e SYDOW (7), para a familia das Capnodiaceas, na ordem das Perisporiales, onde constituiu, junto com outros, a tribu das Chaetothyrias. Essa remoção não foi entretanto baseada na observação do especimen typo de *Chaetothyrium guaraniticum,* que THEISSEN só pôde estudar superficialmente (*), e sim na de uma especie nova encontrada em 1913 por THEISSEN (5) na superficie de folhas de uma planta indeterminada (Dicotyledonea), que RICK colhera no Brasil.

Como o novo fungo, que denominou *Chaetothyrium rickianum,* não possuia perithecios dimidiados, em forma de escudo, e sim perithecios completamente fechados, justificava-se a sua exclusão da familia das Microthyriaceas.

Quanto ao *Chaetothyrium musarum,* THEISSEN não viu o exemplar typo. Como, porém, *Ch. rickianum* possue esporos triseptados, — sendo esse tambem o caso de *Ch. guaraniticum,* conforme THEISSEN pôde verificar, muito embora SPEGAZZINI tenha definido o genero com esporos uniseptados, — o fungo da banana foi transferido para um novo genero, *Chaetothyrina,* com todos os caracteres do primeiro, excepto para os ascosporos que possuem duas cellulas em vez de quatro. Bem entendido, *Chaetothyrina* foi incluido tambem na tribu das Chaetothyrias, familia das Capnodiaceas, na ordem das Perisporiales.

Como disse, *Chaetothyrina musarum* ataca certas variedades de bananas, e é encontrado em abundancia no Brasil meridional. O estudo que fiz desse fungo provou-me que os seus perithecios são realmente, conforme SPEGAZZINI os descreveu, dimidiados, em forma de escudo, sem parede propria em contacto com o substrato, que é a casca da banana. Não pode portanto pertencer á ordem das Perisporiales e sim á das Hemisphaeriales, que hoje comprehende, na classificação de THEISSEN e SYDOW (7), os fungos antigamente incluidos nas Microthyriaceas.

Deante desse facto, tornava-se necessario comparar o fungo encontrado nas bananas do Brasil, não somente com o especimen typo de *Chaetothyrina musarum,* mas tambem com *Chaetothyrium guaraniticum,* no especimen typo do genero, que conforme vimos não pudera ser estudado convenientemente por THEISSEN.

Graças á gentileza do prof. PARODI e da Doutora MARIA JOB, pude receber por emprestimo os dois especimens typo, que pertencem

(*)... "*In Anbetracht des spaerlich besetzten Exemplares die Herstellung von Querschnitten unterbleiben masste.*" (5, pg. 493)

ao Herbario Spegazzini, das collecções mycologicas do Departamento de Botanica do Museu de La Plata (Argentina). (*).

CHAETOTHYRIUM GUARANITICUM SPEGAZZINI

Eis a diagnose do fungo (traduzida do Sylloge Fungorum [3]), dada por SPEGAZZINI, que evidentemente nunca viu o fungo em secções transversaes.

Chaetothyrium SPEG. F. Guar. II, n.º 123 (Etym. *chaete*, pêlo e *thyrion*, janella). Perithecios pequenos, dimidiados em forma de escudos, pretos, sem subiculo, munidos de pêlos rigidos. Ascos com 8 esporos, sem paraphyses. Ascosporos didymos, hyalinos. Genero lindo, differindo de *Microthyrium* pela presença de pêlos nos perithecios.

Chaetothyrium guaraniticum SPEG. F. Guar. II, n.º 123 — Sem maculas. Perithecios situados nas duas faces das folhas, esparsos, dimidiados em forma de escudo, pequenos, com 100 a 150 μ de diam., pretos, astomos, com paredes finamente membranaceas, transparentes, com estructura subparenchymatica no centro, mucoso-evanescente, olivaceo-pallido, na peripheria, providos na parte superior de poucos pêlos (8 a 12) erectos, rectos, um tanto rigidos, com 50-120 por 5 μ, e com base sub-bulbosa, preta, opaca. Ascos cylindricos, um tanto clavados ou subclavados, com a parte superior subtruncada, arredondada, com paredes espessas, a parte inferior conica, sustentados por um pedicello curto e grosso, com 40 x 10 μ, sem paraphyses, contendo 8 esporos. Ascosporos dispostos em duas filas em posição vertical ou obliqua, ellipticos ou subovaes, um tanto obtusos nas duas extremidades, com 10-14 por 4-5 μ, septados no centro (talvez, finalmente, munidos de tres septos?) pouco ou não constrictos no septo, hyalinos.

Hab. em folhas vivas de especie indeterminada. Solanacea? nos cerrados de Guarapí. Brasil.»

THEISSEN (5) mostrou ser esta diagnose incorrecta em varios pontos. Tendo verificado que *Ch. rickianum* não possue conceptaculos em forma de escudo, affirmou, embora sem ter visto o fungo em secções transversaes, que *Ch. guaraniticum* tinha a mesma estructura, rectificando da seguinte maneira a diagnose de SPEGAZZINI:

«Os ascos são ovoides, 30-24 μ, sem paraphysas; os esporos medem 15-19 x 5-5,5 μ, e são arredondados em ambas as extremidades, não constrictos no septo, hyalinos, divididos em 4 cellulas mais ou menos eguaes (SPEGAZZINI viu somente esporos immaturos). Pêlos mycelianos marron escuro, afinados na extremidade, com 10 μ de espessura na base, assentados numa base com 28-38 μ de largura; medem até 380 μ de comprimento. O subiculo é bem desenvolvido (a indicação do autor «subiculo destituto» é incorrecta) e é composto, como na especie anterior, de hyphas entrozadas, vesiculosas, molles, com elementos cellulares frouxos, flexiveis, bojudos; na proximidade dos conceptaculos as hyphas têm septos mais aproximados, formando uma especie de pseudo-parenchyma; as formas filamentosas tornam-se mais distinctas á medida que se afastam dos conceptaculos, os elementos cellulares tornam-se mais compridos, até que na

(*) Quero deixar aqui consignados os meus agradecimentos ao prof. Parodi e á Doutora Maria Job, que tiveram a amabilidade de confiar-me os preciosos especimens, o que me permittiu fazer o estudo que é o objecto da presente publicação.

peripheria o subiculo se prolonga em um reticulo frouxo, muito claro, feito de hyphas ramificadas («margine mucoso-evanescente»). Os conceptaculos propriamente ditos quasi não se differenciam no microscopio dos de *Ch. rickianum*, somente a disposição concentrica das cellulas rectangulares achatadas em torno do ostiolo apresenta-se mais distinctamente.»

* * *

O especimen de SPEGAZZINI está contido num pequeno enveloppe quadrado, por sua vez collocado dentro de outro enveloppe que traz a seguinte indicação: «Museu de La Plata, Departamento de Botanica, Herbario Spegazzini, Colecciones Micológicas, n.º 1.011, Chaetothyrium Sp. n. g. guaraniticum Sp. Guarapí-Paraguay, Leg. B. Balansa, X-1883». A indicação do Sylloge Fungorum, acima transcripta, situando Guarapí no Brasil está portanto errada.

O pequeno enveloppe quadrado contido no outro que leva as indicações que acabo de mencionar, está escripto á mão, pelo proprio SPEGAZZINI, que tambem desenhou as principaes caracteristicas do fungo.

Estes desenhos e os dizeres que os acompanham estão reproduzidos na fig. 1. Por estes se vê que SPEGAZZINI tinha effectivamente visto esporos com 3 septos, que representou. Na sua diagnose, entretanto, refere-se a elles com duvidas: «*...sporidis... medio 1-septatis (an postremo 3 septulatis?)...*».

O especimen compõe-se de uma unica folha incompleta e de um pequeno fragmento da mesma folha. Acompanha-o uma tira de papel com as seguintes indicações, do proprio punho de BALANSA: 4.088, Guarapí — Octobre 1883. (Est. I, fig. A).

Na superficie da folha distinguem-se a olhos nús umas manchas escuras que, ao microscopio, mostram-se constituidas pelo mycelio e pelos conceptaculos de uma Microthyriacea e de uma Pycnothyriacea. Os conceptaculos de *Chaetothyrium guaraniticum*, em numero inferior a 40, são invisiveis a olho desarmado e mesmo com uma lupa de fraco augmento. Com augmentos de 20 a 40 diametros, apresentam-se como pequenos botões isolados e esparsos, pretos, com reflexos luzidios, embora com superficie não perfeitamente lisa. Estes conceptaculos acham-se munidos na peripheria de longos pêlos pretos (Est. I, fig. B). O mycelio, ou melhor, o subiculo, que os acompanha, é completamente invisivel na superficie da folha vista com esses augmentos. De espaço em espaço, porém, notam-se pêlos isolados, esparsos, erectos, semelhantes aos pêlos dos conceptaculos, que indicam a presença de algum mycelio hyalino e invisivel unindo entre si esses pêlos e os conceptaculos.

Deante da escassez do material usei, no meu estudo, tão somente uma dezena de conceptaculos, seccionando tres delles e montando o restante directamente, por inteiro, no lactophenol, para observação superficial, afim de verificar a estructura das paredes e do ostiolo. Ficaram no especimen cerca de 30 perithecios que fornecem amplo material para estudos ulteriores.

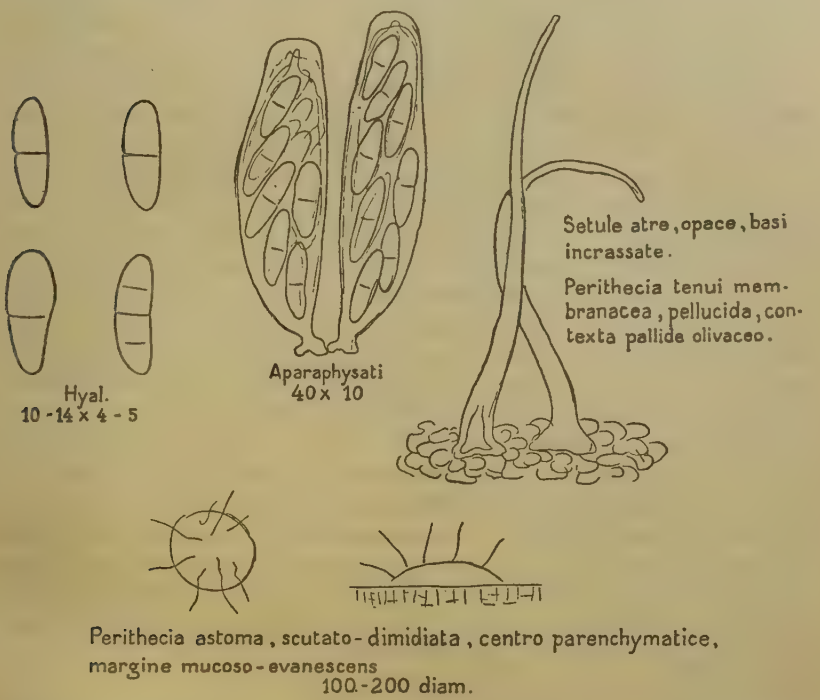


Fig. 1 — *Chaetothyrium guaraniticum* SPEG. Reproducção das indicações e dos desenhos feitos a lapis, por SPEGAZZINI, sobre o enveloppe que contem o especimen typo. x 2. (Rep. por J. F. Toledo)

A observação dos perithecios montados por inteiro e vistos com luz transmittida, mostra a estructura typicamente pseudo-parenchymatica da parede (Est. I, fig. C). Os conceptaculos não são astomos, como affirma SPEGAZZINI, e o ostiolo, bem definido, é nitidamente delimitado pela disposição circular dos elementos cellulares da parede do conceptaculo, mas a abertura central acha-se completamente obstruida pelas periphyses da parte superior interna do perithecio, conforme se pode verificar nas secções transversaes (Est. I, fig. D).

Na superficie dos conceptaculos, geralmente ao longo da região mediana ou equatorial, estão inseridos longos pêlos pretos, em tudo semelhantes aos que se acham esparsos na superficie da folha.

A forma geral do conceptaculo é redonda na região typicamente pseudo-parenchymatica, que tem paredes cellulares de côr escura. Em torno dessa região, porém, distingue-se uma «franja» de coloração clara, feita de um tecido myceliano reticulado, de contorno mal definido, constituido por hyphas frouxas, de coloração quasi hyalina. Tal franja não é visivel na fig. C, Est. I, por ser quasi transparente e, principalmente, por não estar focalizada, sendo mais baixa que a parte superior do conceptaculo que foi focalizada na photographia. E' essa franja, — indicada por uma seta, em secção transversal, na fig. D da Estampa I, — que SPEGAZZINI designou por «*margine mucoso evanescente*». A descripção dessa franja, feita por THEISSEN, é um tanto confusa. Affirma elle que, ao contrario do que descreve SPEGAZZINI, o subiculo existe. Por subiculo entende-se, evidentemente, o reticulo myceliano presente em innumeras Perisporiales e Hemisphaeriales, reticulo esse, geralmente escuro e que forma maculas mais ou menos visiveis a olho nú, na superficie do substrato. Tal subiculo será descripto adeante para *Ch. musarum*. Quando o subiculo é hyalino ou muito claro, não ha maculas visiveis e alguns autores têm omittido, na diagnose de certos fungos, a descripção desse subiculo ou reticulo myceliano.

Em sua descripção do subiculo de *Ch. guaraniticum*, THEISSEN (5) affirma que elle é bem desenvolvido e forma uma especie de pseudo-parenchyma na proximidade dos conceptaculos, ao passo que suas hyphas se tornam mais individualizadas, constituindo um reticulo frouxo, na peripheria. THEISSEN refere esta ultima parte do subiculo á indicação de SPEGAZZINI «*margine mucoso-evanescente*», dando portanto a entender que SPEGAZZINI viu effectivamente o subiculo, ou parte do subiculo, embora não o tenha considerado como tal. Ora, é evidente que a indicação de SPEGAZZINI diz respeito á «franja» a que acima me refiro, e não ao subiculo propriamente dito, que é hyalino, invisivel na superficie da folha examinada com lupas de forte augmento, e que SPEGAZZINI considera inexistente.

De accordo com minhas observações, o subiculo não cobre uniformemente o substrato, mas forma faixas constituidas de hyphas parallelas, densamente aggregadas, á semelhança de rhizomorphas, que unem entre si os conceptaculos e os pêlos isolados. Nos intervallos entre as faixas, o subiculo é constituido simplesmente por uma fina trama reticulada de hyphas. Em torno dos pêlos isolados, as faixas que ahi vão ter, constituem um verdadeiro pseudo-parenchyma dentro do qual está inserido o pêlo (Est. I, fig. F).

Em corte transversal torna-se mais facil comprehender a constituição da «franja». Pratiquei taes cortes em tres conceptaculos (*) que forneceram um bom numero de secções.

Nestas, constata-se que a affirmação de SPEGAZZINI, de que os conceptaculos de *Ch. guaraniticum* são dimidiados e em forma de escudo, está errada. Este fungo, conforme affirmou THEISSEN, possue exactamente a estructura por elle descripta para *Ch. rickianum*. A fig. D, da estampa I, mostra bem a forma globosa, fechada, caracteristica das Perisporiales, e as duas alas lateraes que são a secção transversal da «franja», caracteristica da tribu das Chaetothyrias. A seta preta da figura B, indica a peripheria hyalina da franja ou «*margine mucoso-evanescente*» de SPEGAZZINI.

Graças a essas secções, ainda é possivel rectificar algumas affirmações erroneas de SPEGAZZINI. A disposição dos elementos cellulares na parte superior do conceptaculo indica nitidamente a presença do ostiolo; existem diversas camadas no tecido pseudo-parenchymatico das paredes, não sendo estas portanto «tenui-membranaceis» como quer SPEGAZZINI. Nellas se distinguem duas tunicas, uma externa, constituida por 4 a 5 camadas de elementos cellulares rectangulares, curtos, de paredes escuras e que somente são visiveis na parte superior do conceptaculo e na franja peripherica, e outra interna, de coloração mais clara, constituindo numerosas camadas (5 a 8) de elementos cellulares igualmente rectangulares, porém muito mais longos e estreitos do que os primeiros. O conceptaculo de *Chaetothyrium guaraniticum* pode pois ser interpretado como sendo um perithecio superficial globoso de Perisporiale, coberto de um escudo, semelhante ás fructificações das Hemisphaeriales e inteiramente coalescente com o perithecio na parte central. No fundo e nos lados do perithecio encontra-se um tecido ascigero hyalino, possivelmente feito de varias camadas egualmente, mas onde não é possivel distinguir os elementos cellulares. Na proximidade do ostiolo, esse tecido acha-se substituido por periphyses

(*) As secções transversaes em conceptaculos superficiaes pouco adherentes ao substrato, como sejam os das Perisporiales e das Hemisphaeriales, requerem uma technica differente da que geralmente se applica com outros fungos microscopicos. A inclusão em parafina, quando se trata de perithecios esparsos, rarissimos, na superficie das folhas, exige um trabalho de observação de innumeras preparações, até que sejam, por acaso, encontradas as secções que interessam. Os cortes a mão livre, entre hemicylindros de medulla de sabugueiro, são impraticaveis, uma vez que em muitos casos as cellulas da medulla pouco menores são do que os proprios conceptaculos. Alem disso, no momento do corte, a secção do perithecio se destaca da secção do substrato, sendo facilmente perdida quando não se trabalha debaixo de lupas com ampliações bastante elevadas.

Costumo substituir a medulla de sabugueiro por duas laminas de cortiça que podem ficar imprensadas entre os hemicylindros de sabugueiro por meio de uma pinça ou de um annel de borracha. Os perithecios, procurados individualmente na superficie da planta hospede, debaixo do microscopio binocular, são destacados com uma agulha e collocados cuidadosamente entre as laminas de cortiça, que são em seguida apertadas com a pinça. Praticam-se depois secções transversaes, a mão livre, com uma navalha bem afiada. Todas essas operações, assim como as que se seguem, são feitas debaixo da lupa binocular com augmento de 20 a 60 diametros. Com alguma habilidade consegue-se praticar cerca de uma dezena de secções em cada conceptaculo de Hemisphaeriales com 100 a 150 μ de diametro e 15 a 20 μ de altura. As secções são colhidas na ponta de uma agulha e transferidas a uma gottinha de lacto-phenol disposta sobre a lamina e em seguida coberta por uma laminula de pequenas dimensões. As novas lupas binoculares de diversos fabricantes reputados, munidas de 3 ou 4 objectivas em revolver ou tambores, são extremamente praticas para esses trabalhos.

hyalinas, incurvadas para o centro do perithecio e com extremidades ligeiramente dilatadas.

Os ascos, numerosos, dispostos em todo o fundo do conceptaculo, sobre o tecido ascigero, correspondem bem á descripção de SPEGAZZINI, embora THEISSEN rectifique a sua forma para «ovoide», o que não tem muita importancia, uma vez que um mesmo asco pode ser cylindraceo ou ovoide, de accordo com a pressão lateral que soffre por parte dos ascos visinhos. SPEGAZZINI viu unicamente esporos immaturos, bicellulares, dando delles uma boa descripção. THEISSEN descreve os esporos maduros, ligeiramente maiores e com tres septos. Os dois typos de esporos podem ser encontrados simultaneamente no mesmo perithecio, conforme se vê na figura E. da estampa I.

O exame que fiz do exemplar typo de *Ch. guaraniticum* confirma, pois, plenamente, o estudo de THEISSEN e justifica a remoção do genero *Chaetothyrium* das Hemisphaeriales para as Perisporiales.

CHAETOTHYRINA MUSARUM (SPEG.) THEISSEN

Conforme disse acima, este fungo foi descripto por SPEGAZZINI em 1899. Eis a diagnose do autor italiano, traduzida do Sylloge Fungorum (3, vol. 16, p. 636).

Chaetothyrium musarum SPEG. Fg. Arg. novi v. crit. p. 297 (1899). Sem maculas ou com maculas orbiculares, pouco visiveis, ás vezes pallidas, outras vezes fusco muito claro, grandes, frequentemente confluentes. Perithecios esparsos ou mais ou menos agrupados irregularmente na macula, em pequeno numero, dimidiados, em forma de escudo, com 150 a 200 μ de diam., com paredes feitas de uma membrana fina, abertos no centro por um pequeno poro, pretos, com estructura pouco distincta e de côr preto-fuliginea no centro, prosenchymatico-fibrosa e quasi transparente na parte media, mucoso-evanescente na peripheria, que é dobrada para cima, providos de pêlos em pequeno numero, de 4 a 9, erectos, finos, com 50-80 por 4-5 μ, preto-fuligineos, quasi transparentes, sem septos, sem subiculo. Ascos ellipsoidicos, com a base munida de um curto pé conico, com 40-45 x 10-12 μ, sem paraphyses (talvez em raras occasiões com pouquissimas paraphyses?) com 8 esporos. Ascosporos cylindraceos, um tanto clavados, rectos ou ligeiramente incurvados, um tanto obtusos nas duas extremidades, com 14-15 x 4-5 μ, a principio hyalinos, em seguida chlorinos, munidos de um septo, constrictos na altura do septo, com cellula superior mais curta e grossa, com 6 μ de comprimento, cellula inferior mais longa e fina, com 8 μ de comprimento.

Hab. sobre a superficie de fructas de bananeiras comestiveis, em todo o Brasil, o Paraguay, o Uruguay e a Argentina.

SPEGAZZINI cita pois como habitat de *Ch. musarum* o Brasil, o Paraguay, o Uruguay e a Argentina. Acredito, porém, que elle se refira á occorrencia das fructas no commercio desses paizes, e não propriamente á distribuição das bananeiras atacadas, o que de certo

seria de muito maior interesse. De facto, como uma grande parte das bananas consumidas na Argentina e no Uruguay, especialmente na região do Rio da Prata, são provenientes do Brasil, a area de habitat do fungo, restricta aos lugares onde a bananeira é cultivada, não deve ter a extensão assignalada por SPEGAZZINI.

THEISSEN (5) não viu *Ch. musarum,* mas achou que, pela descripção de SPEGAZZINI, estava sufficientemente demonstrado que a sua estructura era identica á de *Ch. guaraniticum.* Como este ultimo tem esporos triseptados, THEISSEN criou para o novo fungo, que de accordo com SPEGAZZINI tem esporos com um septo só, o novo genero *Chaetothyrina* (*).

THEISSEN e SYDOW (7) incluem *Chaetothyrina,* junto com *Chaetothyrium,* na tribu das Chaetothyrias, familia das Capnodiaceas, na ordem das Perisporiales, com a restricção, — como vimos anteriormente apresentada por THEISSEN (5), — referente á possibilidade de não estar correcto o numero, dado por SPEGAZZINI, das cellulas de ascosporos de *Chaetothyrina musarum,* e admittindo a possibilidade deste fungo ser tão somente um *Chaetothyrium* com esporos immaturos.

Deante de taes duvidas e na impossibilidade de afastal-as, por não possuir o exemplar typo de SPEGAZZINI, e tambem por differenças pequenas com a diagnose de *Ch. musarum,* SYDOW (4), para designar 3 novos fungos que descreve, creou o novo genero *Microcallis*, que tem os caracteres de *Chaetothyrium,* porém com esporos bicellulares. Nada, ou quasi nada, distingue o novo genero, de *Chaetothyrina,* mas SYDOW preferiu crear novo genero a incluir as suas novas especies nesse genero duvidoso. As novas especies descriptas são *Microcallis Phoebes, M. consociata* e *M. amadelpha.* Ao mesmo genero, PETRAK e CIFERRI (1) juntaram a especie *M. megalospora.*

Mais tarde, PETRAK e SYDOW, tiveram finalmente ensejo de estudar o proprio exemplar typo de *Ch. musarum* (2). Entretanto, confessam que o exemplar somente apresentava vestigios do fungo, o que não permittiu um exame sufficientemente meticuloso e portanto uma descripção adequada. Em suas secções transversaes do material, não lograram encontrar o fungo e tiveram que se contentar com preparações de raspagens superficiaes do substrato.

Um exame tão imperfeito, conduziu esses autores, conforme veremos, a uma conclusão errada, o que era de esperar deante da technica deficiente por elles empregada. O exame de fungos tão delicados não pode ser feito por meio de secções praticadas a esmo. E' indispensavel seccionar individualmente os conceptaculos, procurando-os debaixo da lupa binocular de dissecção, recolhendo-os com uma

(*) *Chaetothyrium musarum* SPEG. (F. Argent. novi p. 297 [1899]) hat nach der Beschreibung zweizellige Sporen und muss deshalb — die Richtigkeit der Angabe vorausgesetzt — generisch abgetrennt werden. Ich nenne die Gattung *Chaetothyrina* TH. Die, wenn auch unbestimmte, Beschreibung der Flecken und Gehaeuse laesst hinreichend erkennen, dass der Pilz ebenso gebaut ist wie die erste Art. (5 pag. 495).

agulha fina, com ou sem parte do substrato, para em seguida, sempre debaixo dos fortes augmentos da lupa binocular, transportal-os entre laminas de cortiça, onde são praticadas as secções, conforme acima descrevi. Sem uma technica tão minuciosa, raramente empregada, é verdade, pelos mycologos descriptores, a obtenção de secções transversaes do fungo é mera obra do acaso.

A descripção de *Chaetothyrina musarum* por PETRAK e SYDOW (2) é a seguinte:

«Conceptaculos irregular e esparsamente distribuidos sobre a superficie cinzento-escura ou de coloração mais ou menos preta, do substrato. Mycelio livre pouco apparente, escasso, feito de hyphas muito irregularmente ramificadas em reticulo muito frouxo, indistinctamente septadas, mais ou menos sinuosas, em regra somente muito pouco tintas de amarello ou quasi hyalinas, raramente bruno um tanto escuro, com 2 a 3 μ de diametro. O mycelio que, não raro é fortemente reduzido e falta quasi completamente, é provido de pêlos muito esparsos, frequentemente solitarios, erectos, rectos ou muito levemente sinuosos, mais raramente um tanto serpentinos, com paredes mais ou menos grossas, rigidos, em regra indistinctamente septados, bruno escuro por transparencia, com 40 a 60 μ de comprimento, raramente um tanto mais longos, com 4 a 5 μ de diametro na base, afinando-se progressivamente até a extremidade que é obtusa e frequentemente de coloração mais clara do que o resto do pêlo. Conceptaculos irregularmente arredondados na peripheria, mais ou menos angulosos, com 100 a 170 μ de diametro, raramente um tanto maiores, com parede convexo-plana, levemente abaulada, em forma de escudo, perfurada de um poro central irregularmente anguloso, frequentemente recortado de pequenos dentes, sem limites precisos. A parede, que é glabra ou provida de alguns pêlos mycelianos erectos, é composta de um tecido meandrico-cellular feito de hyphas muito profundamente ramificadas, mais ou menos meandrico-sinuosas, em regra com 1,5 a 3 μ de diametro, com paredes um tanto espessas, com segmentos curtos, bruno-oliva (de côr marron-azeitona) por transparencia. Ascos pouco numerosos, ellipsoidico-allongados, um tanto clavados, apenas, ou muito pouco distinctamente, afinados na extremidade, que é obtusa, repentinamente afinados na base, sesseis ou muito curtamente pedicellados, com paredes duras e bastante espessas, munidos de 8 esporos, e medindo de 30 a 45 μ de comprimento por 10 a 13 μ de grossura. Os esporos do especimen acham-se somente em estado muito novo e são cylindrico-clavados, obtusos nas duas extremidades, as quaes na parte superior são muito levemente, — na parte inferior, muito distincta e progressivamente, — afinadas, rectos ou raras vezes ligeiramente recurvados, em regra septados um tanto acima do meio, não ou muito indistinctamente constrictos no lugar do septo, com plasma indistinctamente granuloso, medindo de 12 a 15 μ de comprimento por 4 a 5,5 μ de largura. Paraphysoides muito escassos, compostos em regra de uma massa indistinctamente filamentosa, escassa, situada, na base, entre os ascos.

A indicação de SPEGAZZINI «subiculo destituto» não está de accordo com os factos, pois existe um mycelio, embora este seja muito escasso e fortemente reduzido. Os esporos que observamos estavam ainda completamente immaturos e sempre hyalinos. O autor os descreveu, porém, como «amarellos esverdeados».

Por este estudo de *Chaetothyrina musarum,* que elles mesmo reconhecem ser incompleto, PETRAK e SYDOW convenceram-se entre-

tanto de que *Microcallis* não podia ser separado de *Chaetothyrina*, uma vez que ambos se assemelhavam, no tocante aos principaes caracteres, nem podiam deixar de ficar incluidos entre as Chaetothyrias.

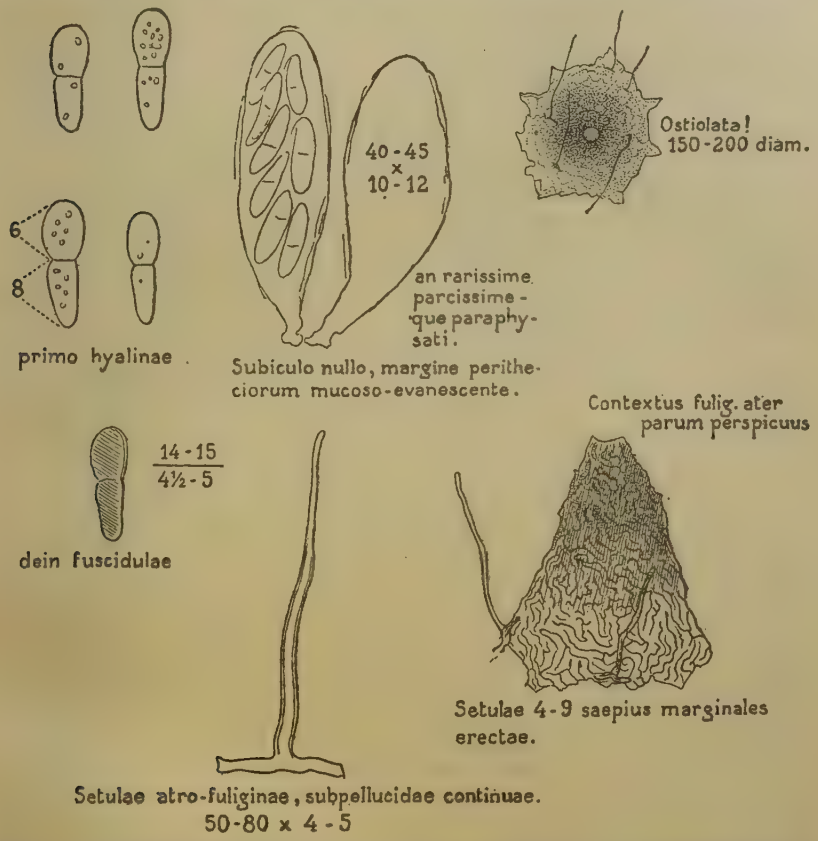


Fig. 2 — *Chaetothyrina musarum* (Speg.) Theiss. Reproducção das indicações e dos desenhos feitos a lapis, por Spegazzini, sobre o enveloppe que contem o especimen typo. x2. (Rep. por J. F. Toledo).

Reverteram portanto a especie *musarum* ao genero criado por Theissen onde incluiram tambem, como combinações novas, as 4 especies de *Microcallis* acima citadas.

* * *

O especimen typico de *Ch. musarum* Spegazzini está, como *Ch. guaraniticum*, contido num pequeno enveloppe quadrado que traz desenhos a lapis, feitos pelo autor (fig. 2 e fig. A, Est. 2). O material

consta de 4 fragmentos de casca de banana. Infelizmente foi elle muito mal tratado por pessoas inhabeis, que ao invez de procurar os conceptaculos, individualmente, debaixo da lupa binocular, rasparam a superficie dos fragmentos, provavelmente com um escalpello. Não fosse o facto do especimen não ter sido seccado por pressão, estendido entre folhas de papel chupão, o que não teria permittido a formação das rugas profundas que elle apresenta, não haveria mais, hoje, um só conceptaculo para se examinar. Felizmente essa circumstancia permittiu que os conceptaculos existentes entre as rugas não fossem alcançados pelo escalpello, podendo elles serem encontrados, embora com difficuldade, devido á côr escura do material. E' possivelmente esse especimen, assim estragado por um observador pouco cuidadoso, que PETRAK e SYDOW tiveram o ensejo de examinar, o que explica a difficuldade que experimentaram em seu estudo.

De qualquer forma, pude montar diversos perithecios de *Ch. musarum* e comparal-os com os que se encontram na superficie de bananas cobertas de «fuligem» produzidas em diversos pontos do Brasil meridional (Est. II, fig. B). Trata-se, sem a menor sombra de duvida, do mesmo fungo.

THEISSEN, por falta de exame do especimen typo, e PETRAK e SYDOW, por causa de um exame imperfeito do mesmo, laboraram em um grave erro ao incluir *Chaetothyrina* entre as Chaetothyrias, nas Perisporiales. E' portanto indispensavel rectificar a descripção dada por esses autores, restituindo o fungo ás Hemisphaeriaceas, a que pertence pela estructura de seus conceptaculos, que são thyriothecios typicos, isto é, perithecios dimidiados, em forma de escudo. A descripção seguinte é ao mesmo tempo baseada sobre o exemplar typo de SPEGAZZINI e sobre exemplares de casca de banana prata existentes no herbario na Secção de Phytopathologia do Instituto Biologico sob os numeros 242 (colhido em Santos por J. DESLANDES em Novembro de 1931) e 279 (colhido por H. GRILLO no Districto Federal em 30 de Dez. de 1931).

As manchas de fuligem são constituidas, como disse, por um fino revestimento myceliano, de côr cinzenta, na superficie da banana, á semelhança de um deposito muito leve de fuligem. SPEGAZZINI dá o seu contorno como orbicular, o que pode acontecer para manchas pequenas e isoladas. Geralmente, porém, as manchas são numerosas e extensas, coalescentes, cobrindo grandes areas da fructa, e com contornos irregulares, mal definidos.

Esse revestimento myceliano, ou subiculo, é pouco espesso e não opaco, deixando vêr, portanto, a casca da fructa com sua côr na-

tural. Por isso mesmo a fuligem é menos apparente na fructa verde, mais escura, do que na fructa madura, de côr amarello-clara.

Examinando-se a mancha de fuligem com uma lupa de bom augmento, notam-se pontinhos pretos, isolados, esparsos, que são as fructificações ou conceptaculos do fungo (Est. II, fig. B).

Para se comprehender a estructura microscopica do subiculo e dos conceptaculos, é indispensavel conhecer a estructura da epiderme da casca das bananas. Na variedade prata, as cellulas epidermicas formam, em sua parede externa, uma protuberancia accentuada ou verdadeira papilla (Est. 2, fig. G). E' a presença dessas papillas, tão numerosas quanto as cellulas epidermicas, que dá a casca desta variedade, o aspecto avelludado que a caracterisa. As mesmas papillas podem ser observadas na banana figo, ao passo que são pouco desenvolvidas na banana maçã e completamente inexistentes na banana nanica cuja casca é perfeitamente lisa.

Ao microscopio pode-se verificar que o subiculo é constituido por filamentos escuros, anastomosados, formando um reticulo de malhas largas. Esses filamentos acham-se situados em torno das papillas, acompanhando, pois, mais ou menos, o contorno das cellulas epidermicas. Parecem estar immersos numa fina pellicula, muito levemente colorida, que une entre si as malhas do reticulo, sem entretanto cobrir totalmente a superficie da casca da fructa, pois a pellicula não se estende por cima das papillas. Essa fina pellicula, quasi hyalina, é encontrada tambem no subiculo de diversas Hemisphaeriales e parece ser produzida pelo proprio fungo.

As papillas epidermicas da casca da banana fornecem, apparentemente, um ponto de apoio indispensavel ao reticulo myceliano, o que talvez seja o motivo pelo qual não foi encontrada a fuligem em variedades de bananas de casca lisa, sem papillas epidermicas como a banana nanica.

De espaço em espaço, os filamentos mycelianos do reticulo são providos de ramificações verticaes, que são verdadeiros pêlos erectos, mais ou menos rigidos, quebradiços, com paredes grossas e coloração marron escuro. As vezes uma pequena porção da hypha, dos dois lados do pêlo, tem egualmente paredes grossas e escuras, formando o conjuncto um T invertido (Est. 2, fig. F).

Os conceptaculos, quando vistos superficialmente, com os fortes augmentos das lupas binoculares, até certo ponto, apresentam, o aspecto dos conceptaculos de *Ch. guaraniticum,* o que justifica em parte a confusão de Spegazzini. São pequenos botões salientes, pretos ou marron muito escuro, com reflexos luzidios, geralmente com uma ligeira depressão no meio. Nota-se, entretanto, que em *Ch. guaraniticum* o

botão parece ter o seu contorno bem destacado do substrato, ao passo que no fungo da banana, o botão acha-se mais nitidamente adherente, com sua peripheria unindo-se insensivelmente, por um léve declive, á superficie da casca. Os pêlos, quando existem, são muito mais curtos e com ponta menos afilada que os de *Ch. guaraniticum*.

As differenças accentuam-se quando os conceptaculos são montados entre lamina e laminula e examinados ao microscopio. Verifica-se então que a estructura das paredes dos conceptaculos é inteiramente differente nos dois fungos. *Ch. guaraniticum* tem, como vimos, paredes formadas de um verdadeiro pseudo-parenchyma. O fungo da banana, porém, tem paredes com estructura muito especial, onde se distinguem ainda as hyphas, com bastante nitidez. Não ha portanto a apparencia de um tecido cellular como no pseudo-parenchyma. As hyphas, entretanto, não podem ser acompanhadas por longas distancias como em alguns tecidos prosenchymaticos de fungos, pois ellas se entrelaçam e se ramificam de forma a constituir um tecido complexo, de estructura difficil de descrever. Esse tecido serviu a THEISSEN (6) para caracterisar uma tribu da familia das Hemisphaeriaceas, as Plochmopeltineas cujos conceptaculos elle descreve do seguinte modo: *Peltothecia orbicularia, hyphis maeandrice sinuosis contexta.* Nas Plochmopeltineas, é geralmente possivel distinguir uma direcção, no sentido radial, das hyphas entrozadas, e até certo ponto esta tribu constitue uma transição entre as Microthyriaceas, com conceptaculos cujas paredes são feitas de hyphas radiaes divergentes a partir do centro, e as Hemisphaeriaceas, de estructura mais ou menos pseudo-parenchymatica. No caso do fungo da fuligem da banana, entretanto, a estructura typica das Plochmopeltineas acha-se ligeiramente modificada. As hyphas formam pequenas areas circulares, ou melhor, polygonaes, não perfeitamente definidas, porém sufficientemente visiveis, mesmo na photographia da fig. C, (Est. 2). Essa estructura explica-se perfeitamente pela configuração da epiderme da banana da variedade «prata», cujas cellulas, conforme acima dissemos, são providas de uma dilatação externa na forma de uma papilla saliente.

Examinando-se os conceptaculos ainda muito novos, verifica-se que a parede em formação occupa todo o espaço entre as papillas, formando portanto um reticulo, como o subiculo, porém com malhas mais largas, feitas de hyphas mais numerosas. As papillas apparecem como pequenas areas redondas, claras, rodeadas pelas hyphas que affectam uma disposição polygonal. Posteriormente, com a formação dos tecidos internos dos conceptaculos, as paredes, inicialmente em contacto com a epiderme, levantam-se e destacam-se desta ultima. A partir desse momento, as papillas não constituem mais um obstaculo

á formação das paredes e as pequenas areas claras, acima referidas, enchem-se com ramificações das hyphas, completando-se dessa forma as paredes dos conceptaculos.

Como na peripheria do conceptaculo a parede não se levanta, continuando adherente á epiderme da fructa, permanece descoberta a parte mais proeminente das papillas, as quaes, condicionam assim o contorno do conceptaculo, limitado pelos arcos formados em torno dessa série circular de pequenas areas arredondadas, claras (Est. 2, fig. D).

A estructura que acaba de ser descripta observa-se na casca da banana prata. Na variedade maçã, as papillas são, como dissemos, menos proeminentes e as pequenas areas polygonaes nas paredes dos conceptaculos não são tão nitidamente differenciadas (Est. 2, fig. E). Neste hospede, portanto, *Chaetothyrina musarum* apresenta a estructura typica das demais Plochmopeltineas.

O centro do conceptaculo é occupado por um poro ou pseudo-ostiolo, cujos contornos não são perfeitamente definidos, mas que se distingue facilmente, mesmo com os fracos augmentos do microscopio, por ser de coloração clara, em contraste com o resto da fructificação.

Os pêlos, que têm a mesma estructura que os pêlos mycelianos, podem faltar completamente na superficie dos conceptaculos.

A verdadeira conformação dos conceptaculos somente pode ser observada em córtes transversaes (Est. 2, fig. G). Nestes, constata-se que a estructura de *Ch. musarum* é inteiramente diversa da de *Ch. guaraniticum*. As paredes dos conceptaculos não formam uma bolsa completamente fechada. Constituem um verdadeiro escudo, caracteristico da familia das Hemisphaeriaceas, cabendo-lhes perfeitamente a definição de Spegazzini: «*dimidiato-scutatis*».

As paredes, constituidas por duas ou tres camadas de tecido de coloração escura, somente cobrem a parte superior da fructificação. Os ascos são inseridos num tecido ascogeno mal definido, apparentemente em contacto immediato com a epiderme da fructa. A disposição geral dos ascos é erecta, com ligeira inclinação ou convergencia para o pseudo-ostiolo. Os paraphysoides, que Spegazzini apenas entreviu, são anastomosados, por cima dos ascos, formando um fino reticulo entre este e o pseudo-ostiolo. Dentro dos ascos estão oito ascosporos, quasi sempre uniseptados. Em uma unica occasião encontrei um conceptaculo com esporos quadricellulares. A vista do numero enorme, — varias centenas, — de conceptaculos com esporos bicellulares até hoje examinados, pode-se admittir como uma rarissima excepção a presença de tres septos nos ascosporos.

Nas numerosas observações feitas até hoje, somente encontrei esporos hyalinos, parecendo-me que elles permanecem sem côr mesmo após completa maturação. Em seu desenho do fungo, SPEGAZZINI (fig. 2) representa um esporo escuro, com a indicação «*dein fuscidulis*». Na sua diagnose, elle escreve «*dein chlorinis*», côres essas que nunca observei.

Ch. musarum tem portanto conceptaculos de uma verdadeira Hemisphaeriale, isto é, «thyriothecios» com paredes formando um simples escudo por cima dos ascos. A sua posição entre as Perisporiales, nas Capnodiaceas da tribu das Chaetothyrias, não é, portanto, sustentavel. Pela estructura das paredes do thyriothecio, o fungo pertence ás Hemisphaeriaceas e, nesta familia, á tribu das Plochmopeltineas, que são caracterisadas por hyphas entrozadas, formando um tecido labyrinthico-plectenchymatico. E' verdade que o fungo se afasta ligeiramente das Plochmopeltineas puras, pela disposição peculiar das hyphas, em circulos ou polygonos, mas essa particularidade, como vimos, é derivada exclusivamente da presença de papillas epidermicas no hospede e não subsiste ou é pouco accentuada, quando essas papillas são fracamente desenvolvidas, como na banana maçã. Sendo uma Plochmopeltinea, o fungo da fuligem das bananas, approxima-se pela presença de pêlos nos conceptaculos, do genero *Chaetopeltopsis* (5) de que se afasta, entretanto, pela presença de paraphysoides.

O genero *Chaetothyrina*, portanto, é uma Hemisphaeriacea Plochmopeltinea, hyalodidyma, com thyriothecios munidos de pêlos, contendo paraphysoides. A sua diagnose, devidamente rectificada, é a seguinte, gentilmente revista pelo Dr. K. SILBERSCHMIDT.

Chaetothyrina SPEG. *(gen. Hemisphaeriaceae Plochmopeltineae) char. em.*

Mycelium superficiale, reticulatum, brunneolum, maculas cinereas parum perspicuas formans, setulis atris, erectis, praeditum. Thyriothecia solitaria, sparsa, rotundata, margine crenata, contextu floccoso-meandriformi, brunneo, poro centrali praedita, setulis atris, peripherie insidentibus. Asci octospori, clavati, erecti, ex strato ascigero parvo oriundis. Sporae 1-septatae, hyalinae. Paraphysibus paucis, anastomosantibus.

Das diversas especies descriptas, somente *Chaetothyrina musarum* corresponde á descripção supra. As outras se enquadram perfeitamente no genero *Microcallis*, primitivamente creado por SYDOW para incluil-as, e inadvertidamente transferido para os *nomina nuda*. Voltam, portanto, á sua denominação primitiva que é a seguinte: *Microcallis Phoebes* SYD., *M. consociata* SYD., *M. amadelpha* SYD. e *M. megalospora* PET. et CIF.

SUMMARY

Chaetothyrina musarum (Speg.) Theissen, (syn. *Chaetothyrium musarum* Speg.) *is the cause of sooty-blotch of the banana (Musa sapientum* L.) *a common disease of the varieties «prata» and «figo», and occasionally found on «maçã», in Southern Brazil. Chaetothyrium with four-celled ascospores, and Chaetothyrina with two-celled ascospores were removed by* Theissen *from the Hemisphaeriales to the Perisporiales. An examination of the type specimens of Chaetothyrina musarum and of Chaetothyrium guaraniticum* Spegazzini, *type of the genus Chaetothyrium, has shown that while the latter is a Perisporiale, with closed conceptacles, Chaetothyrina musarum is a Hemisphaeriale with typical shield-like perithecia. An amended diagnose of the genus Chaetothyrina is therefore given and the other species Ch. Phoebes* Syd., *Ch. consociata, Ch. amadelpha* Syd. *and Ch. megalospora* Pet. & Ciff. *are reverted to the genus Microcallis of the Perisporiales where they were first classified until* Petrak *and* Sydow *considered it a synonym of Chaetothyrina.*

BIBLIOGRAPHIA

1 — Petrak, F. und Ciferri. — 1932 — Fungi Dominicani. II. *Ann. Mycol.* **30**: 145-353.

2 — Petrak, F. und Sydow, H. — 1934 — Kritisch - systematische Originaluntersuchungen über Pyrenomyzeten, Sphaeropsideen und Melanconieen. *Ann. Mycol.* **32**: 1-35.

3 — Saccardo, P. A. — 1891-1902 — *Sylloge Fungorum.* **9**: 1891; **16**: 1902, Patavii.

4 — Sydow, H. — 1926 -- Fungi in itinere costaricensi collecti. *Ann. Mycol.* **24**: 283-426.

5 — Theissen, F. — 1913 — Über einige Mikrothyriaceen. *Ann. Mycol.* **11**: 493-511.

6 — Theissen, F. — 1914 — De Hemisphaerialibus. Notae Supplendae. *Broteria.* Serie Botanica. **12**: 73-96.

7 — Theissen, F. und Sydow, H. — 1917 — Synoptische Tafeln. *Ann. Mycol.* **15**: 389-491.

———o———

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 1

Chaetothyrium guaraniticum SPEGAZZINI

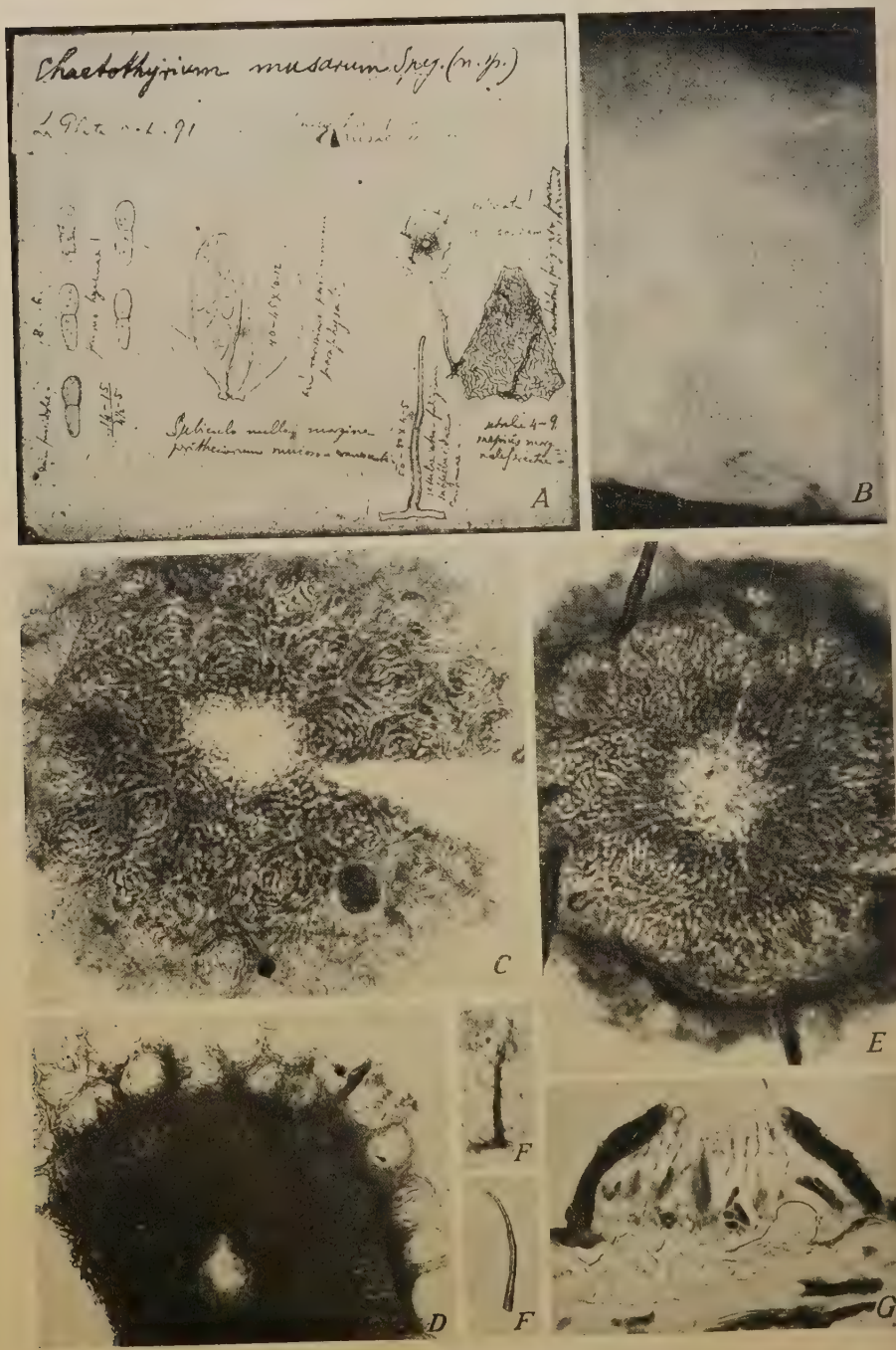
Fig. A — Especimen typo do herbario de SPEGAZZINI com rotulo escripto por BALANSA.
Fig. B — Conceptaculos vistos em luz reflectida, sobre a superficie da folha (×100).
Fig. C — Conceptaculo visto por transparencia, montado em lacto-phenol (× 400).
Fig. D — Secção transversal de um conceptaculo (× 400).
Fig. E — Ascos (× 1000).
Fig. F — Pêlo sobre uma almofada pseudoparenchymatica (× 150).

Estampa 2

Chaetothyrina musarum (SPEG.) THEISS.

Fig. A — Enveloppe do exemplar typo do herbario de SPEGAZZINI com desenhos a lapis de autoria de SPEGAZZINI (cf. fig. 2).
Fig. B — Superficie de uma banana da variedade «prata» coberta de manchas de «fuligem». Os pontinhos pretos são os conceptaculos ou thyriothecios do fungo (× 2).
Fig. C — Thyriothecio do especimen typo de SPEGAZZINI achatado e quebrado, debaixo da laminula, para ser estendido num plano só, afim de mostrar os detalhes de sua estructura (× 400).
Fig. D — Thyriothecio da casca da banana prata, mostrando a estructura de sua peripheria (× 400).
Fig. E — Thyriothecio da casca da banana maçã (× 500).
Fig. F — Pêlos mycelianos (× 400).
Fig. G — Secção transversal de um thyriothecio da casca da banana prata, colorido com azul algodão. O conteúdo dos ascosporos e dos paraphysoides acha-se fortemente colorido. Nota-se á direita dos ascosporos uma grande papilla epidermica. O pseudo-estiolo dilatou-se na preparação, mas é normalmente muito mais estreito (× 400).

CHAETOTHYRIUM GUARANITICUM Spegazzini



CHAETOTHYRINA MUSARUM (Speg.) Theiss.

COMPARAÇÕES CULTURAES E INOCULAÇÕES EM VIDEIRA COM OS FUNGOS "ELSINOE FAWCETTI", "E. AMPELINA" E "E. VENETA"

POR

A. E. Jenkins [1]

Trabalho do Bureau of Plant Industry, U. S. Department of Agriculture

Com 9 figuras no texto e estampas 3-5

INTRODUCÇÃO

Sphaceloma fawcetti JENKINS (7) foi identificado como pertencente ao genero *Sphaceloma* DBY. pela primeira vez em 1925, identificação essa, baseada principalmente em um estudo de culturas desta especie, em comparação com *S. ampelinum* DBY. (1), a especie typo do genero, e tambem com *Plectodiscella veneta* BURKHOLDER (3). Esse estudo comparativo nunca foi publicado por extenso, o que se torna necessario para referencias futuras e como indispensavel complemento aos trabalhos que a autora vem realizando desde aquelle anno, relativamente a esses fungos e a outros do mesmo grupo. E' pois o objecto do presente trabalho a relação dessas comparações culturaes, juntamente com observações sobre a formação de conidias em *S. fawcetti,* observações que tambem foram de utilidade na identificação deste fungo.

Damos egualmente o resultado de experiencias posteriores de inoculações em videira, com os tres mesmos fungos. Empregamos neste trabalho a moderna terminologia dos tres organismos hoje incluidos no genero *Elsinoe* RAC. (14) sob os nomes especificos *E. fawcetti* (JENKINS) BITANCOURT e JENKINS (2), *E. ampelina* (DBY.) SHEAR (16) e *E. veneta* (SPEG.) JENKINS (9). Estes fungos são, respectivamente, a causa da verrugose dos citrus *(Citrus),* e da anthracnose da videira *(Vitis)* e da amoreira sylvestre *(Rubus).*

Historico

Anteriormente ao presente trabalho, parece não ter havido referencia alguma ás affinidades de *E. fawcetti* com *E. ampelina* ou com *E. veneta.* COBB (6) entretanto, ao assignalar a existencia da verrugose cinzenta do limoeiro na Australia, notou que as conidias do fungo causal, hoje designado por *E. fawcetti scabiosa* (MC. ALP. e TRYON)

(1) Grande parte do presente trabalho consta da these ainda não publicada, apresentada á *Graduate School of Cornell University,* Ithaca, Estados Unidos, em Junho de 1927, para preenchimento parcial dos requisitos para obtenção do titulo de Doutor em Philosophia.

JENKINS (12), são parecidas, na forma e no tamanho, com as de *E. ampelina.*

Com referencia a *E. ampelina* e *E. veneta,* BURRILL (5) observou que, em seus respectivos hospedes, as formas conidianas desses dois fungos são semelhantes, senão identicas. Essa estreita semelhança foi illustrada por SCRIBNER (15), cujos desenhos foram reproduzidos por JENKINS (10). SHEAR (16) assignalou a semelhança senão a identidade dos dois fungos, quando cultivados em cultura pura, e lembrou a conveniencia de se fazerem inoculações cruzadas para verificar a sua identidade. BURRILL (5) fizera, anteriormente, inoculações cruzadas, transferindo conidias de um hospede para o outro, com resultados duvidosos.

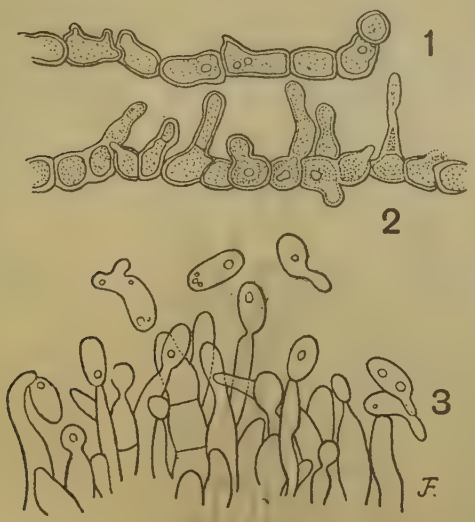
Comparações de culturas

As comparações de culturas, representadas na estampa 3, mostraram que, em cultura, *E. fawcetti* possue os mesmos caracteres geraes que *E. ampelina* e *E. veneta.* Essas comparações foram feitas antes de se fazer a distincção (8, 11) entre os chamados typos de crescimento convoluto e pulvinado, caracteristicos dos fungos deste grupo, e num momento em que a autora somente possuia uma cultura de cada um dos tres fungos, sendo, estas, convolutas para *E. fawcetti* e *E. ampelina* e pulvinada para *E. veneta.* Publicou-se portanto que as culturas com o crescimento, de um modo geral, mais rugoso ou convoluto, isto é, as duas primeiras, embora distinctas uma da outra, eram mais parecidas entre si do que a cultura de *E. veneta,* do typo pulvinado, que frequentemente affecta a forma de uma almofada, como o proprio nome indica. Em uma comparação posterior, em que uma cultura de *E. veneta,* do typo convoluto, foi comparada com as duas culturas convolutas de *E. fawcetti* e *E. ampelina, E. veneta* mostrou-se nitidamente distincta das demais. Uma comparação representativa destas tres culturas foi publicada em outro lugar (11, est. 4, J. L. M.).

As diluições em caixa de PETRI em agar de farinha de milho, das conidias de *E. fawcetti* e *E. ampelina,* forneceram culturas de apparencia muito semelhante. Com 5 dias, essas culturas eram de coloração clara e separaveis uma da outra, principalmente devido á maior quantidade de substancia viscosa que cobria os thallos de *E. ampelina.* No dia seguinte a distincção tornou-se ainda mais notavel pela coloração vermelha que se manifestou em muitos dos thallos de *E. ampelina.* Na photographia em fundo preto, taes thallos somente se tornam visiveis pelos reflexos luminosos sobre o revestimento viscoso (Est. 4).

Formação de conidias em E. fawcetti

A formação de conidias em *E. fawcetti* foi conseguida transferindo-se pequenos pedaços de estroma do fungo, obtido em culturas inclinadas de batata-dextrose-agar, para a superficie de um meio de cultura de farinha de milho-agar em caixas de PETRI, ou de uma fina camada do mesmo meio sobre laminas de vidro conservadas em camaras humidas constituidas por caixas de PETRI. A figura 3 fornece exemplos de semelhante esporulação e do desenvolvimento ulterior das conidias. A figura 1 representa um pedaço de hypha no momento

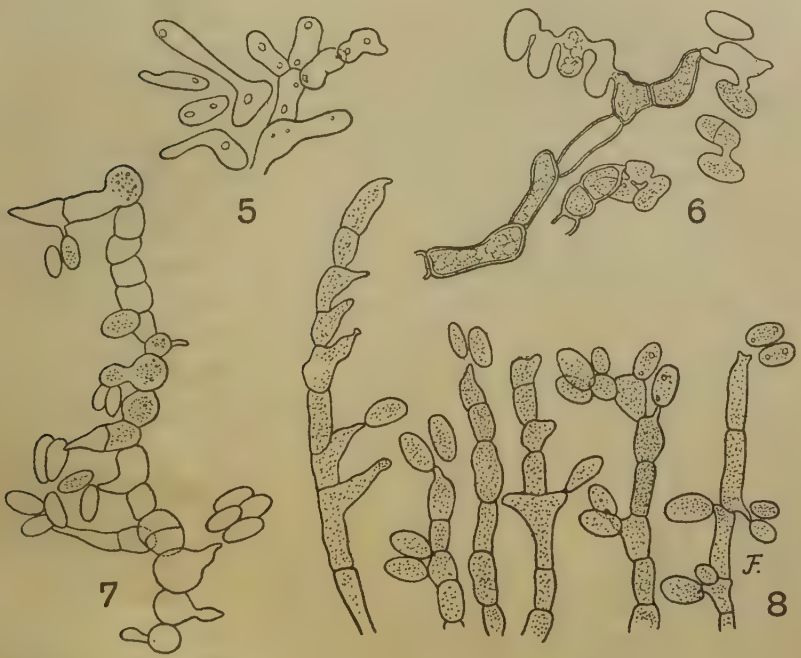


Elsinoe fawcetti — Formação e germinação das conidias. Fig. 1 — Aspecto de uma hypha no momento em que foi repicada. Fig. 2 — Formação ulterior de conidiophoros em uma hypha semelhante. Fig. 3 — Fila de conidiophoros produzida na superficie de uma repicagem após 24 horas. x 900.

de sua transferencia para o novo meio; a figura 2 a producção de conidiophoros sobre uma hypha semelhante, no fim de 16 horas, quando se inicia a formação conidiana; a figura 3, a fila de conidiophoros, juntamente com conidias, no prazo de 24 horas; a figura 4, uma porção identica, ao fim de 96 horas. As conidias representadas na figura 5, algumas dellas já em germinação, foram produzidas em um pedaço

Fig. 4 — *Elsinoe fawcetti.* — Continuação do desenvolvimento de uma região semelhante á que representa a fig. 3, em uma cultura com 96 horas. *a, b,* e *c,* conidias fortemente dilatadas; *a* e *c,* ainda presas ás hyphas onde foram produzidas; *a* e *b,* germinadas. x 900.

de estroma transferido 14 horas antes. A formação de conidias a partir de hyphas recentemente desenvolvidas está representada nas figuras 6, 7 e 8. A figura 9 mostra o desenvolvimento progressivo de conidias recentemente formadas, e observadas a diversos intervallos num periodo de 60 horas. A primeira observação está representada pela primeira fila na parte superior da figura e a ultima pelas



Elsinoe fawcetti — Fig. 5 — Conidias, provenientes de uma repicagem, dentro de 14 horas, em parte brotando umas das outras. Figs. 6, 7 e 8 — Conidias formadas em hyphas recentemente desenvolvidas em tres culturas differentes, algumas (fig. 6) produzindo conidias secundarias. x 900.

5 conidias germinadas, ou dilatadas, na parte inferior. A formação e o desenvolvimento de conidias que acabam de ser descriptos são essencialmente os mesmos assignalados (4, 13, 18), para culturas de *E. veneta*. A semelhança das conidias antes e depois de germinadas, de *E. fawcetti* e *E. ampelina* em culturas parallelas, foi illustrada em outro trabalho (7).

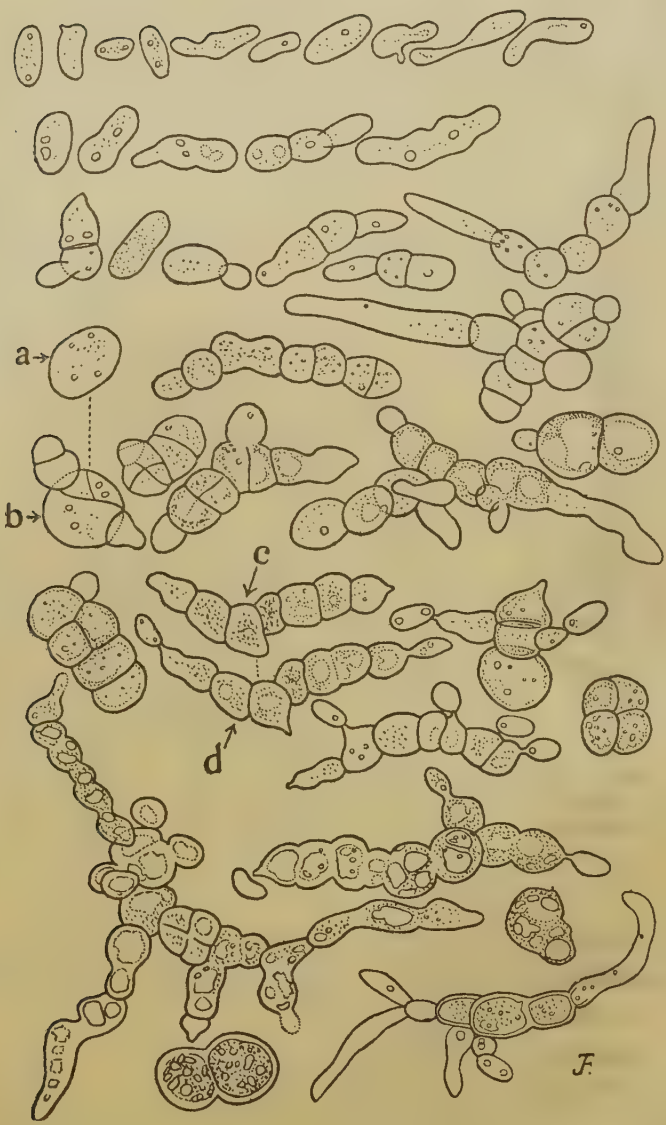


Fig. 9 — *Elsinoe fawcetti* — Desenvolvimento de conidias durante um periodo de 60 horas; *a* e *b*, representam a mesma conidia e *c* e *d* uma outra. x 900.

Inoculações em videira

Experiencias de inoculação em videira, com as tres culturas originaes de *E. fawcetti, E. ampelina* e *E. veneta* foram feitas no mesmo anno em um vinhedo commercial perto de Orlando, Florida, Estados Unidos. Quatro filas visinhas numa extremidade do vinhedo, considerado da casta RONALDO, foram escolhidas para a experiencia. A extremidade da fila n.º 1 foi reservada para testemunha e recebeu o mesmo tratamento que as filas inoculadas, com excepção do inoculum, que não foi applicado. As filas 2, 3 e 4 foram respectivamente inoculadas com *E. fawcetti, E. ampelina* e *E. veneta*. As inoculações foram feitas em Março, quando o novo surto de vegetação estava justamente começando. Fizeram-se 20 inoculações com cada um dos fungos. As 20 testemunhas da fila 1 receberam o mesmo tratamento que as filas inoculadas, porém sem o inoculo.

Utilizaram-se na experiencia somente brotos que estavam desabrochando ou rebentos com o maximo de 4 centimetros de comprimento, e usou-se quasi toda a vegetação nova com essas dimensões, nas 4 filas em experiencia. Os sarmentos velhos apresentavam algumas lesões de anthracnose, mas a vegetação nova estava completamente limpa no momento das inoculações. Dois dias mais tarde, encontraram-se algumas lesões nessa vegetação, o que foi verificado, porém, somente em rebentos de varios centimetros de comprimento, e não nas filas experimentaes.

O methodo de inoculação foi essencialmente o mesmo que WINSTON (19) empregou em suas inoculações em citrus com *E. fawcetti*. Na presente experiencia, usaram-se, para inoculo, culturas de 10 dias de edade, de cada um dos fungos. A cultura foi macerada em agua esteril e em seguida espalhada na superficie de chumaços de algodão. Estes foram applicados com o fungo em contacto com os rebentos. Envolveu-se o conjuncto em papel parafinado, o qual foi removido depois de 48 horas, prazo após o qual os chumaços de algodão foram encontrados seccos.

Ao entrar no vinhedo, 4 semanas depois que as inoculações tinham sido feitas, os rebentos enfesados e doentes da fila 4 attrahiram immediatamente a attenção da autora. Uma inspecção detalhada mostrou que se tratava dos rebentos inoculados, gravemente atacados de anthracnose da videira (Est. 5, A e B).

Havia infecção muito leve ou moderada nas filas 1 a 3, o que certamente era resultado de inoculações naturaes com *E. ampelina* (Est. 5, C). Em todas as 4 filas, foram perdidas de 4 a 6 inoculações ou testemunhas originaes, principalmente devido á falta de desen-

volvimento dos brotos. Os que cresceram produziram de 1 a 3 rebentos. Nas filas 1, 2 e 3, os rebentos mais compridos mediam de 60 a 90 centimetros e somente um delles media apenas 20 centimetros. Todos os 49 rebentos em experiencias eram, em média, de 50 centimetros, ao passo que mediam 26 centimetros os 21 rebentos inoculados da fila 4. As dimensões destes ultimos variavam de 3 a 60 centimetros e mais da metade media somente cerca de 18 centimetros, com diametro pequeno, na mesma proporção. Todos os 10 isolamentos feitos a partir dos rebentos inoculados da fila 4 e tambem dos rebentos experimentaes das filas 1 a 3, produziram culturas typicas de *E. ampelina.*

Algumas inoculações addicionaes em videira, semelhantes ás que acabam de ser descriptas, foram feitas em Abril de 1927, em uma estufa do Departamento de Pathologia Vegetal de Cornell University, Ithaca, Nova York, Estados Unidos, com *E. ampelina* e *E. veneta.* Foram obtidas, de um viveiro, plantas em estado dormente, das castas Vergennes e Moore's Diamond, ambas altamente susceptiveis á infecção por *E. ampelina.* Essas plantas foram transplantadas para vasos e inoculadas quando appareceram novos rebentos. *E. ampelina,* inoculada em ambas as variedades, deu resultados positivos em todos os casos, ao passo que a cultura convoluta de *E. veneta,* inoculada em Vergennes, deu resultados negativos. As testemunhas permaneceram sãs.

ABSTRACT

A cultural study on the basis of which Sphaceloma fawcetti was first identified as of the form genus Sphaceloma is reported. This consisted of comparisons of this fungus, now known in its perfect stage as Elsinoe fawcetti, with Sphaceloma ampelinum and Plectodiscella veneta, also now classified in the genus Elsinoe as E. ampelina and E. veneta. In inoculation experiments on grape with the three organisms only E. ampelina produced infection. The results of the experimental work gave no evidence that E. ampelina and E. veneta are identical, as suggested by earlier literature.

BIBLIOGRAPHIA

1 — Bary, A. de — 1874 — Ueber den sogenannten Brenner (Pech) der Reben. *Ann. Oenol.*, **4**: 165-167.

2 — Bitancourt, A. and Jenkins, A. E. — 1936 — The perfect stage of the citrus scab fungus. *Phytopathology*, **26**: 393-396.

3 — Burkholder, W. H. — 1917 — The perfect stage of the fungus of raspberry anthracnose. *Phytopathology*, **7**: 83-91.

4 — Burkholder, W. H. — 1917 — The anthracnose disease of the raspberry and related plants. *New York (Cornell) Agr. Exp. Sta. Bul.* 395.

— Burrill, T. J. — 1882 — Blackberry and raspberry cane rust. *Agr. Rev.*, **2 (4)**: 89-92.

6 — Cobb, B. A. — 1895 — Grey scab of the lemon. *Agr. Gaz. N. S. Wales*, **6**: 865.

7 — Jenkins, A. E. — 1925 — The citrus scab fungus. *Phytopathology*, **15**: 99-104.

8 — Jenkins, A. E. — 1931 — The development of the citrus scab organism, *Sphaceloma fawcetti*. *Jour. Agr. Res.*, **42**: 545-558.

9 — Jenkins, A. E. — 1932 — Elsinoe on apple and pear. *Jour. Agr. Res.*, **44**: 689-700.

10 — Jenkins, A. E. — 1933 — Application of the terms «anthracnose» and «scab» to plant diseases caused by *Sphaceloma* and *Gloeosporium*. *Phytopathology*, **23**: 389-395.

11 — Jenkins, A. E. — 1934 — *Sphaceloma perseae* the cause of avocado scab. *Jour. Agr. Res.*, **49**: 859-869.

12 — Jenkins, A. E. — 1936 — Australian citrus scab caused by *Sphaceloma fawcetti viscosa*. *Phytopathology*, **26**: 195-197.

13 — Jones, L. K. — 1924 — Anthracnose of cane fruits and its control. *Agr. Exp. Sta. Univ. of Wisconsin. Research Bull.* 59.

14 — Raciborski, M. — 1900 — *Elsinoe* Rac. nov. gen. Magnusiellae affinis. *In* Parasitische Algen und Pilze Java's, **1**: 14-15.

15 — Scribner, F. L. — 1890 — Fungus diseases of the grape and other plants and their treatment. 134 pp. J. T. Lovett Company, Little Silver, N. J.

16 — Shear, C. L. — 1915 — Grape anthracnose in America. *Off. Rept. Intern. Cong. Vitic.* 1915: 111-117.

17 — Shear, C. L. — 1928 — The life history of *Sphaceloma ampelinum* de Bary. *Phytopathology*, **19**: 673-679.

18 — Stoneman, B. — 1898 — A comparative study of the development of some anthracnoses. *Bot. Gaz.*, **26**: 69-120.

19 — Winston, J. R. — 1923 — Citrus scab: Its cause and control. *U. S. Dept. Agr. Bull.* 1118.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 3

Culturas parallelas de *Elsinoe fawcetti, E. ampelina* e *E. veneta* na ordem respectiva em meio inclinado de agar, com a seguinte composição: *a-c,* Molisch; *d-f,* batata-dextrose; *g-i,* Czapek; *j-l,* caldo de carne; *m-o,* farinha de milho; *p-r,* glycerina. As culturas *A* e *C,* têm um mez, a cultura *B,* 17 dias, e as demais approximadamente 20 dias. × 1. Desenhado por J. Marion Shull.

Estampa 4

Diluições de conidias de *(A) Elsinoe fawcetti* e *(B) E. ampelina* com 6 dias, em culturas parallelas sobre farinha de milho-agar. × 1.

Estampa 5

Figs. *A* e *B* — Rebentos de videira com um mez de edade, gravemente atacados, inoculados com *E. ampelina.*

Fig. *C* — Rebento representativo da fila testemunha.

Um pouco reduzido.

a
b
A
c
d
e
B
f
g
h
C
i
j
k
D
l
m
n
E
o
p
q
F
r

A
B
C

A IMPORTANCIA DA "ESPECIE" NO SYSTEMA DAS PLANTAS E A TENTATIVA DA SUA DELIMITAÇÃO POR NOVOS METHODOS

POR

K. Silberschmidt

Trabalho do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 3 figuras no texto e estampas 6-7

No decurso do ultimo decennio o conceito do principio fundamental da chimica, do «*elemento*», soffreu profunda transformação dentro do systema periodico. Assim tambem o elemento basico do systema botanico, isto é, a *especie,* passa no momento por um processo de transformação semelhante.

Para se poder comprehender a importancia da especie dentro do systema botanico, deve-se indagar em primeiro lugar qual o objectivo da systematica botanica e qual a sua base de classificação. Essa disciplina, que geralmente só interessa aos especialistas, tem comtudo a funcção de resolver duas questões muito importantes: de um lado, crear a possibilidade de coordenar em grupos facilmente distinguiveis uns dos outros, a enorme quantidade de formas vivas observadas na natureza, e de outro, classificar esses grupos de maneira que se possa reconhecer as suas multiplas relações de affinidades. O primeiro postulado origina-se da necessidade pratica de uma seriação das formas vivas, ao passo que a segunda attende á exigencia de conhecer as chamadas affinidades naturaes entre as especies.

As difficuldades que se interpõem á escolha de um criterio seguro e inatacavel para a classificação botanica evidenciam-se sobremaneira quando consideramos o systema adoptado pelos chimicos para a classificação dos seus elementos. As partes de que se compõe esse systema foram coordenadas segundo uma só propriedade — o peso atomico —, a qual porém se revelou por tal forma fundamental e predominante, que a ella se subordinam grande numero de outras propriedades.

Tomando por base esse systema, tornou-se possivel não só prever a existencia dos elementos ainda não descobertos, mas tambem conhecer de antemão importantes propriedades desses mesmos elementos.

Não se conhece na botanica uma propriedade de tal proeminencia, como o peso atomico na chimica, capaz de servir de base para a classificação das innumeras formas vegetaes observadas na natureza. Tambem não é possivel conceber-se uma unidade biologica perfeita-

mente correspondente ao elemento chimico, pois com a subdivisão até o elemento desappareceriam as condições de vitalidade, que caracterisam o organismo. Emquanto o systema periodico dos elementos chimicos constitue uma cadeia apenas de 92 elos, o systema botanico abrange um numero quasi incalculavel de grupos diversos de organismos, bastando, para disso formar-se ideia, lembrar que só as variedades de plantas phanerogamas attingem a cerca de 160.000. (19).

O que difficulta ainda mais a classificação, é a circumstancia de existirem nos seres vivos, além das propriedades de natureza substancial, que elles partilham com os seres inorganicos, caracteristicos de ordem morphologica, sendo difficil decidir qual dos dois grupos de propriedades deva preponderar. Visto serem os caracteres da forma (morphologicos) de mais facil analyse, foram elles tomados para base do systema de classificação hoje adoptado. Tambem entre esses caracteristicos morphologicos tomou-se em consideração não apenas um unico criterio, como seja o modo de evolução dos orgãos da reproducção, para isoladamente servir de base á classificação das formas vegetaes, mas procurou-se delimitar essas unidades naturaes do systema vegetal, apoiando-se em amplo conhecimento, abrangendo todo o conjuncto de caracteres morphologicos, como os de tamanho, crescimento, coloração, numero, agrupamento (disposição) e estructura dos orgãos.

Plantas que apresentam coincidencia de todos os caracteres morphologicos reputados importantes são collocadas no mesmo grupo, ao passo que as que differem em muitos desses caracteres são classificadas em grupos afastados, do systema.

No eschema annexo estão assignaladas as designações dos grupos do systema. A unidade deste, isto é, um grupo systematico, que é tão circumscripto que abrange exclusivamente individuos praticamente iguaes, é designada como especie. Justamente pela uniformidade que caracterisa os individuos da mesma especie é que a ella se attribue o valor de uma unidade natural, e se lhe empresta grande importancia pratica e theorica. Especies que se assemelham por muitos caracteres são reunidas formando um genero, e os generos que apresentam certo numero de caracteristicos communs formam uma familia. Unidades systematicas mais elevadas são chamadas ordens, classes, troncos.

CLASSE	*Angiospermae*
SUB-CLASSE	*Dicotylae*
SERIE	*Sympetalae*
ORDEM	*Personatae*
FAMILIA	*Solanaceae*
GENERO	*Nicotiana*
ESPECIE	*Tabacum*

A figura n.º 1 tem por fim dar uma idea, embora muito superficial, do systema das plantas phanerogamas. Familias que pertencem á mesma classe, como por exemplo as *simpetaleas,* são salientadas pela mesma tonalidade. A riqueza de cada familia em especies é representada pela extensão da area que occupa.

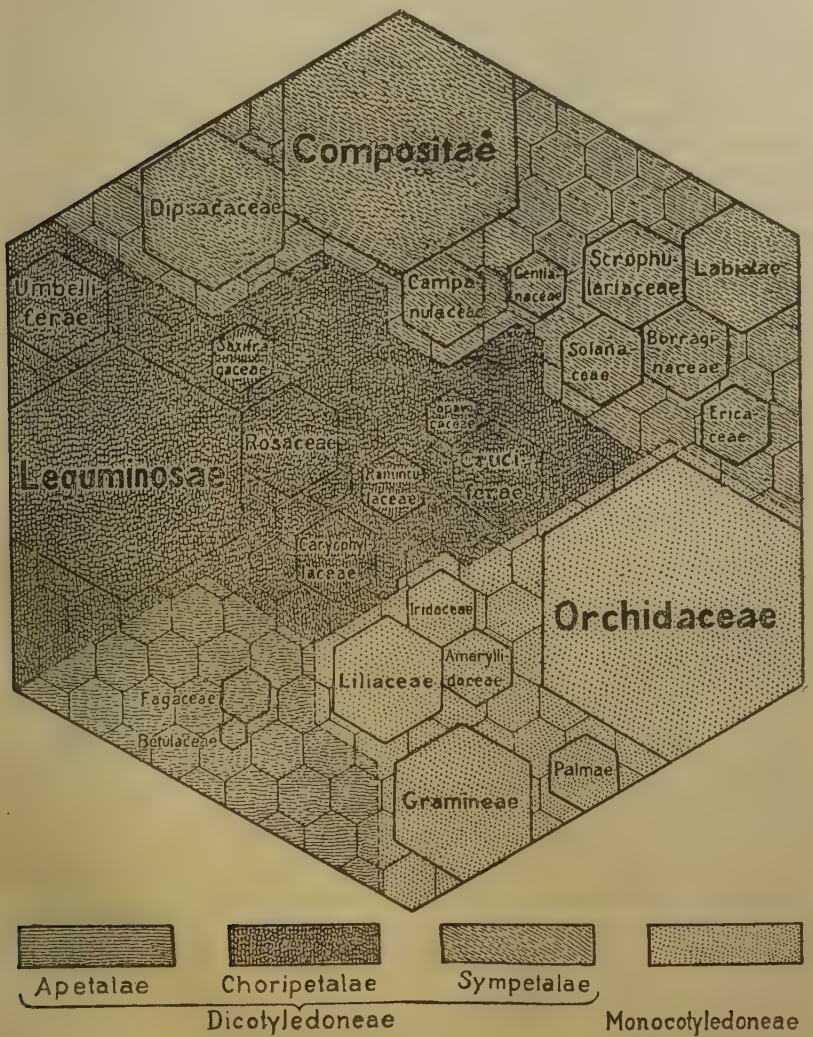


Fig. 1 — Representação graphica levemente alterada de SCHARFETTER-SCHMUT (19) do systema das plantas superiores (Segundo a riqueza das familias em especies).

Vamos agora, sempre tendo em vista a concepção da especie, averiguar até que ponto o systema de plantas actualmente adoptado dá conta dos dois problemas que lhe compete resolver. Para isso vamos tomar por ponto de partida as especies que podem ser perfeitamente differenciadas umas das outras pela classificação segundo o systema natural. Assim, por exemplo, não é difficil distinguir de uma planta normal de tabaco *(Nicotiana tabacum)* um representante do tabaco rustico *(Nicotiana rustica)*. Emquanto a planta de tabaco normal é alta, não forma galhos, tem poucas folhas, mas estas muito grandes, e possue flores vermelhas, o tabaco rustico é ramificado e apresenta pequenas folhas carnosas e flores verdes insignificantes.

Essas differenças entre as duas plantas exigem a sua classificação em diversas especies. Em compensação, ambas as plantas são annuaes, possuem flores campaniformes, formam innumeras pequenas sementes que amadurecem em uma capsula e são por isso subordinadas a um genero commum, ao genero *Nicotiana,* o qual, por sua vez, com muitos outros generos, pertence á familia das *Solanaceas,* á ordem dos *Personatas* e á classe das *Dicotyledoneas*.

Com o auxilio dos caracteres fornecidos pela systematica, torna-se indubitavelmente facil fazer uma distincção clara entre as duas plantas; e a posição dessas especies em relação a outras formas de plantas é determinada com exactidão pela sua posição dentro do systema.

No tempo de LINNEU, (1707-1778), quando foram estabelecidas as bases mais importantes para a edificação desse systema, tinham-se razões para admittir que, aprofundando-se ainda mais os conhecimentos sobre o assumpto, seria possivel não só separar em grupos rigorosamente delimitados todas as formas vegetaes conhecidas, mas tambem fazer uma seriação desses grupos pelo grau de sua affinidade natural. Convencido, ao menos no começo de suas pesquizas, do dogma da constancia da especie, LINNEU defendia a opinião de que existem tantas especies quantas variedades de formas de plantas haviam sahido da mão do Creador. A seriação pelo parentesco natural exigia então somente uma distribuição de taes grupos de plantas de caracteristicos naturaes immutaveis segundo as coincidencias morphologicas exteriores.

Logo depois verificou-se porém que as lacunas de conhecimento, que segundo a supposição de LINNEU eram as unicas que impediam a formação completa de um systema natural, em vez de desapparecerem com o enriquecimento do saber pelos factos adquiridos, avolumavam-se, formando abysmos intransponiveis.

As primeiras difficuldades que se antepuzeram ao systema natural foram mais de caracter pratico. Os trabalhos de LINNEU provocaram uma extraordinaria activação dos trabalhos de pesquizas sobre

systematica, da qual resultou principalmente a creação de uma enorme quantidade de especies novas. Em parte haviam sido essas novas especies encontradas em paizes cuja flora tinha sido até então pouco explorada. Em parte, entretanto, foram constatadas tão grandes differenças entre os componentes de uma especie criada por LINNEU, que se tornou necessario subdividir esse agrupamento systematico em outras especies. Assim, á medida que o numero de especies ia crescendo consideravelmente, ia a linha divisoria entre especies, parallelamente apagando-se.

A distincção de muitas especies, por exemplo no genero dos *Saliæ* dos *Rubus* e dos *Hieracium,* já não se baseia hoje em differenças morphologicas facilmente perceptiveis, mas sim em particularidades secundarias, cuja verificação só pode ser feita com muito esforço e com o auxilio do microscopio.

Importantes objecções, entretanto, que apparentemente até ameaçavam abalar as bases do systema, resultaram da observação feita pela primeira vez por DE CANDOLLE, mais ou menos 50 annos depois da morte de LINNEU, de que em muitos casos não se pode reconhecer pelos caracteristicos morphologicos as relações das affinidades naturaes das especies. Taes observações isoladas se condensaram no correr dos tempos no reconhecimento de que plantas de categorias phylogeneticas muito differentes, quando se desenvolvem sob condições semelhantes e especialmente desfavoraveis, de vida, podem manifestar profundas semelhanças em suas propriedades morphologicas. Essa existencia do mesmo typo morphologico em diversos agrupamentos systematicos é aqui illustrada com alguns exemplos.

Os cactus e as euphorbiaceas apresentam, em alguns de seus representantes, grupos systematicos bem delimitados. As flores hermaphroditas dos cactus são tão differentes das flores (homoicas) caracteristicas das euphorbiaceas, que as duas familias são incluidas em ordens differentes. Mas tambem a formação do systema vegetativo é em regra um factor caracteristico para as duas familias. Emquanto as euphorbiaceas têm quasi sempre folhas normaes e macias, os cactus possuem somente espinhos no seu caule espessado e carnoso.

No deserto de Namib, entretanto, ou seja sob as condições dos desertos sul-africanos, occorrem formas de plantas que, em consequencia da formação das suas flores unisexuadas, são incluidas sem duvida na familia das euphorbiaceas, mas que pela sua apparencia e condições de vida não podem ser distinguidas absolutamente das especies de cactus dos desertos rochosos mexicanos.

Assim como a escassez de chuva dos desertos, actua tambem o clima de certas regiões montanhosas sobre a uniformidade do aspecto

das plantas. O crescimento em forma de coxim, de plantas alpinas das familias mais variadas, indica relações estreitas entre essas formas, as quaes não podem ser provadas pelo typo de suas oospheras.

Nos campos alpinos de cascalho occorrem as almofadas de uma pequena primola, *Androsace glacialis,* como tambem as de uma pequena *Saxifraga androsacea,* as quaes quasi não podem ser distinguidas uma da outra. Entretanto as duas especies de plantas pertencem a familias muito differentes, do systema natural. Tambem as almofadas de uma especie do *Silene acaulis* podem ser facilmente confundidas com a relva das duas outras plantas de regiões montanhosas.

Diante de tal coincidencia morphologica de plantas de identico habitat, repetidas vezes tem sido levantada a questão do direito de excluirmos, apesar disso, qualquer parentesco entre ellas. Pois essas plantas apresentam coincidencia de caracteres que costumamos considerar como essenciaes e preponderantes para o agrupamento de outras unidades do systema botanico, ao passo que divergem entre si em caracteres, de importancia diminuta para a vida da planta.

Essa objecção ficou entretanto sem effeito diante do ataque desenvolvido, em meados do seculo passado, pelos representantes da idea da evolução contra o conceito de systema natural, o que teve como consequencia uma transformação profunda do a que até então se considerava como parentesco ou affinidade natural. Quando DARWIN, animado pela descoberta de restos de seres extinctos e baseado nas observações colhidas na domesticação dos hoje chamados animaes domesticos, affirmou que novas especies podem originar-se por via de uma seleção natural, ficou abalado o dogma da constancia das especies.

Não bastava portanto, para a formação de um systema natural das plantas, separar formas negativas de estructura semelhante e dispol-as em serie; era necessario dispôr as especies de tal modo, que correspondessem aos elos da cadeia evolutiva pela qual, na opinião dos defensores dessa theoria, ellas realmente se originaram pelo processo de evolução natural.

A theoria de DARWIN, que até hoje não pôde obter comprovação definitiva no terreno experimental, logo se impoz como hypothese de trabalho e motivou a tendencia a substituir a ideia de um systema pela de um systema evolutivo.

Comparado com a importancia que tinha a especie em systemas anteriores, tornou-se muito limitado seu valor em um tal systema phylogenetico. Ella apparece aqui apenas como um elo intermediario no decurso da evolução, ligado aos seus visinhos por formas de transição.

Vamos considerar agora uma concepção mais moderna da classe dos phanerogamos que ha pouco contemplamos sob o aspecto mais grosseiro, isto é, o do systema natural primitivo.

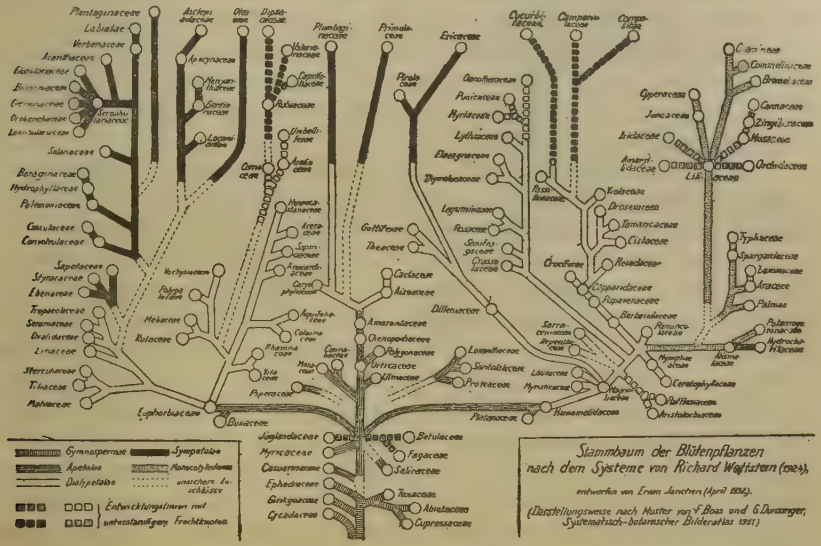


Fig. 2 — Representação graphica do systema phylogenetico das plantas superiores, segundo SCHARFETTER-SCHMUT.

Ahi se ligam os componentes do systema, do ponto de vista da evolução phylogenetica, de modo que as formas mais simples são collocadas na base e as dellas derivadas no apice da arvore genealogica. Dentro desse systema, a especie é considerada como variavel no decorrer de longo periodo, mas assim mesmo ainda representa a unidade. Recentemente FAEGRI (3) propoz substituir e conceito estatico de especie pelo conceito dynamico de «linha de evolução» (cf. tambem HAWKINS (7).) O ultimo resto de sua importancia, a concepção da especie pareceu porém perdel-o quando nas tres ultimas decadas a theoria da hereditariedade cogitou de verificar se os representantes de uma unica especie, tambem do ponto de vista da genetica representam uma unidade. (1).

Para o geneticista nem todos os individuos que têm a mesma apparencia se equivalem; para elle isso só se dá quando a descendencia desses individuos é identica. Si uma planta, após autogamia,

(1) Recentemente, um resumo da litteratura sobre o conceito genetico da especie foi feito por SYDNEY CROSS, *Harland* (Biological Reviews, vol. XI, pag. 83-111, 1936).

produzir atravez de varias gerações, descendentes semelhantes entre si e á planta de que descendem, esta é considerada como hereditariamente pura. Quando, porém, uma planta nessas condições produz descendentes cujos caracteristicos se desviam da planta original e differem entre si, é ella considerada como hereditariamente impura.

Um conjuncto de plantas de aspecto egual, e hereditariamente puras, é designado como uma linhagem pura, ao passo que um conjuncto de plantas apparentemente eguais mas hereditariamente impuras é denominado uma população.

Para os pesquisadores, que procuram agrupar as plantas do ponto de vista rigorosamente genetico, uma linhagem pura dessa natureza representa a verdadeira unidade biologica (25). Se porém abstrahirmos as plantas de reproducção exclusivamente asexuada, não ha uma só especie botanica que possa ser considerada como uma *linhagem pura*. Ao contrario, deve-se admittir como regra que quasi todas as plantas reunidas em uma especie, geneticamente se afastam uma das outras. Estas differenças geneticas entre plantas da *mesma* especie são especialmente pronunciadas entre exemplares de *habitat* muito differente. TURESSON, (26, 27), por exemplo, pôde constatar differenças entre dois grupos de *malmequeres* (Bellis perennis) da mesma especie, um dos quaes procedia dos arredores de Munich e outro de uma ilha da Suecia. E' perfeitamente admissivel a possibilidade de serem duas especies differentes com um mesmo habitat, geneticamente menos afastadas uma da outra, do que duas plantas da mesma especie mas de differente origem. Diante disso TURESSON propõe que se subdividam as especies do systema natural em typos locaes, que corresponderiam a *raças* differentes.

Taes propostas para uma distribuição das especies em grupos geneticos mais individualisados correspondem sem duvida ás necessidades da genetica, mas até agora não decidiram os taxiologos a romper os tradicionaes limites da especie (28).

Esse apego aos limites da especie não se explica sómente pelo facto de trazer o seu abandono uma confusão indiscriptivel, mas tambem porque, apesar de serem ás vezes arbitrarias as delimitações da especie, a conservação dos limites encontra tambem justificativa do ponto da vista da genetica, visto que as plantas pertencentes á mesma especie podem fecundar-se mutuamente, ao passo que na natureza não se verifica, em regra, cruzamento entre representantes de especies differentes. De outro lado, porém, a especie representa um typo especial de adaptação. Como quasi todos os componentes de uma especie se differenciam geneticamente um dos outros, dever-se-ia esperar, desse ponto de vista, que existisse um numero muito maior de especies.

Mas das muitas tendencias hereditarias, que sob forma latente existem nos differentes individuos de uma mesma especie tornam-se patentes exclusivamente aquellas que não são *eliminadas* pelas condições do ambiente. Dahi possuirem os caracteristicos da especie um certo valor de adaptação. Assim, deve a especie ser considerada, não como uma unidade biologica immutavel estampada para a eternidade, mas como um typo formado por tendencias hereditarias e condições de ambiente, que apparece sempre de novo em muitos exemplares.

Que ainda estamos longe de um systema verdadeiramente natural, que abranja de facto todas as series de evolução dos organismos, é um facto que, á vista da significação ainda discutida da unidade desse systema e da falta de clareza de nossos conhecimentos sobre a origem de novas especies, não precisa ser discutido. Na comparação do systema natural das plantas com o systema periodico dos elementos se salientou o facto de que nos seres vivos se consideravam os caracteres morphologicos como primordiaes para a classificação, a qual porisso nelles era baseada. TURRIL (28) constatou que «with very few possible exceptions no greater taxonomic value can be given to any one genotype than to any other on the base of genetical behaviour alone». Como porém não se conseguiu encontrar nenhum desses caracteres morphologicos que pudesse ser tomado como criterio basico de uma differenciação de todos os typos que apparecessem no reino vegetal, não faltaram tentativas para basear a classificação das plantas em um principio de natureza substancial, como o que rege a distribuição dos elementos chimicos. Essas tentativas alcançaram certa importancia nos ultimos annos, ao entrarem em conflicto a systematica e a genetica.

Um tal systema, que maior desenvolvimento attingiu, foi o que se baseava em differenças da estructura da mollecula proteica nas differentes especies de plantas. Essas differenças não são verificadas por methodos chimicos, mas deduzem-se da reacção do corpo animal á introducção, em seu sangue, de extractos das plantas. Este methodo para a determinação da «affinidade natural», é o soro diagnostico. O principio em que se baseia póde ser descripto da seguinte forma: o extracto filtrado de plantas de uma especie, por exemplo, de tabaco, é injectado na veia de um coelho, apparecendo depois de algumas semanas, no sangue desse animal, substancias (anticorpos) que actuam contrariando a influencia do succo do tabaco. Esses anticorpos têm a propriedade de só actuar contra a substancia que provocou a sua formação no sangue.

Essa reacção do organismo animal pode ser verificada por meio de uma experiencia simples in vitro. Collocam-se em um tubo de ensaio algumas gottas de sôro limpido do sangue do animal inoculado,

mais ou menos oito dias depois da ultima injecção, e ajunta-se-lhe cuidadosamente o extracto, tambem limpido, de tabaco, apparecendo então na superficie de contacto dos dois liquidos um annel escuro. Esse annel forma-se porque os anticorpos contidos no sôro precipitam certas substancias do succo do tabaco.

Observou-se então que o sôro de um animal injectado com extracto de tabaco exerce um effeito precipitante não só sobre o summo do tabaco, — Nicotiana tabacum —, mas tambem, ainda que menos intensamente, sobre o summo de Nicotiana rustica, de tomate e batata, isto é, de plantas que, pela divisão usual morphologica, parecem ter affinidade com o tabaco. Baseando-se em numerosas observações, chegou-se á conclusão de que o grao de actividade do sôro sobre qualquer especie de planta corre parelho com a affinidade natural dessa especie com a que provocou a formação dos anticorpos.

Pela comparação do grau de turvação que soffrem os extractos das diversas especies de plantas pelo addicionamento das mesmas quantidades de sôro de um animal injectado, tinha-se um meio de determinar o gráo de affinidade natural entre diversas especies de plantas a serem examinadas. Experiencias dessa natureza, que se extenderam a todos os grupos do reino vegetal, foram feitas em longa escala e com grande sacrificio, esforço e tempo, por Mez e seu alumnos, em Königsberg. A arvore genealogica que Mez construiu baseado nessas experiencias e que em muitos pontos coincide com o systema morphologico, é representada pela figura annexa. Entre os botanicos esses resultados obtidos por Mez e seus alumnos não foram recebidos com muita sympathia. Na avaliação do gráo de precipitação é muito difficil excluir completamente influencias subjectivas e porisso os adversarios do serodiagnostico censuraram a Mez essas falhas do methodo, attribuindo-lhe a construcção de um systema accorde com os seus desejos. Essa critica só era justa por haver grandes defeitos inherentes ao methodo e cuja exclusão não está na capacidade do experimentador.

Recentes investigações de Link (11), Hannig (4, 5) e Moritz (16) vieram porém demonstrar que os methodos serodiagnosticos poderão ser aperfeiçoados de modo a tornarem-se um instrumento de grande valor para a systematica. Cumpre dizer que esse systema representa mais uma ampliação do que uma substituição do systema natural baseado na morphologia, visto que tambem dentro da serologia os individuos de uma especie morphologica são em regra considerados como identicos. Divergencias muito interessantes foram observadas entre os limites serologicos e morphologicos das especies em plantas inferiores.

A introducção do serodiagnostico na systematica botanica foi difficultada pela circumstancia de ser considerada como criterio decisivo para a determinação da especie a reacção do animal, isto é, de um organismo alheio ao systema.

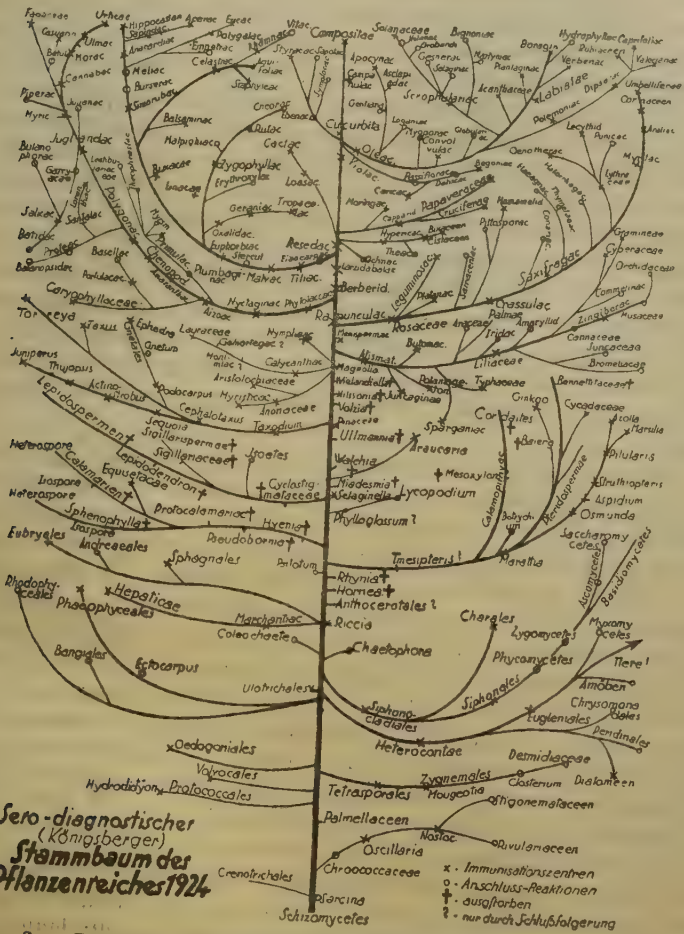


Fig. 3 — Representação graphica do systema serodiagnostico das plantas superiores, segundo MEZ, 1926.

Uma nova epoca serodiagnostica pareceu surgir quando o pesquisador bulgaro D. KOSTOFF, (8) em 1929, baseando-se em innumeras experiencias, affirmou que tambem plantas podem ser estimuladas a

produzir anticorpos contra proteinas extranhas. Acreditava elle que esse phenomeno da formação dos anticorpos se realisa nos enxertos.

Desde a antiguidade é conhecido o facto de plantas de especies differentes poderem ser enxertadas uma na outra. KOSTOFF conseguiu obter em determinado momento muitos exemplares de determinada combinação de enxertos. Em lapsos de tempo regulares a partir do enxerto, elle separava um desses exemplares em suas duas partes componentes — enxerto e cavallo e preparava um extracto do enxerto e outro de uma planta da mesma especie do cavallo. Esses extractos foram cuidadosamente superpostos em tubo de ensaio. Nos primeiros dias após a enxertia o extracto do enxerto quasi não produziu precipitação alguma em contacto com o extracto de plantas normaes identicas á que servira de cavallo. Extracto, porém, de enxertos que já durante semanas estavam em contacto com o cavallo, apresentava um gráo de precipitação consideravelmente maior e que attingia ao seu maximo mais ou menos na 4.ª semana. KOSTOFF concluiu dahi que se formam no enxerto anticorpos contra a proteina da planta que serviu de cavallo e que se pode assim obter, pelo gráo de precipitação, uma avaliação das relações de affinidade entre o enxerto e a planta que serviu de cavallo.

Esse methodo de determinação da affinidade apresentava muitos lados seductores para os botanicos. Como falta á planta um systema circulatorio semelhante ao do animal, torna-se difficil a introducção e diffusão de substancias extranhas por meio de injecções. O methodo do enxerto é, ao contrario, perfeitamente adaptado á constituição da planta e porisso capaz de afastar as difficuldades que até agora impediam uma applicação dos methodos serologicos ao organismo vegetal.

Por occasião da verificação das experiencias de KOSTOFF, que ultimamente emprehendi, (20, 21, 22, 23, 24) fui surprehendido por diversos factos. Primeiramente appliquei, seguindo o exemplo de KOSTOFF, o methodo serologico, e pude então constatar que os extractos dos enxertos revelam, á medida que augmenta o tempo de enxertia, um augmento da intensidade de precipitação, que entretanto somente é perceptivel sob condições muito favoraveis. Quando, porém, mais tarde, passei a adoptar methodos chimicos, verifiquei que esse augmento da capacidade precipitante não é uma consequencia da quantidade de anticorpos do enxerto, mas pode ser devido á sua riqueza em proteinas.

A zona da enxertia, isto é, a superficie de união das duas especies enxertadas, corresponde dentro da planta a uma zona de fronteira, que por muitas substancias não pode ser transposta. Em plantas normaes as substancias proteicas que se formam nas folhas superiores

são conduzidas em grande parte para as partes inferiores do caule e ahi armazenadas como reserva. Nas enxertias, sobretudo entre especies differentes, essa corrente não é completamente interrompida, mas sim retardada e assim acontece que, com o tempo, os enxertos ficam cada vez mais ricos em substancias proteicas. Extractos extrahidos, por pressão, desses enxertos, apresentam sem duvida, em alguns casos, um alto poder precipitante. Que essa capacidade de precipitação não depende da quantidade de anticorpos resalta do facto de enxertos, que estiveram ligados com cavallos da mesma especie mas onde não houve perfeita cicatrização, tambem apresentarem um augmento de substancias proteicas e, com isso, um augmento da sua actividade serologica.

Se bem que taes enxertos, do ponto de vista serologico, não nos tragam esclarecimento algum sobre a affinidade natural das plantas, elles podem porém ser de outra forma utilisados como auxilio para a systematica. Pois pode-se admittir que exista certa relação de affinidade entre duas especies de plantas cuja enxertia uma na outra resulta positiva.

De modo analogo á capacidade de fecundação, tambem a capacidade de adhesão das celulas de duas especies corre até certo ponto parallelamente á affinidade systematica.

Como para a systematica a significação dessas experiencias de enxertia só foi reconhecida nos ultimos tempos, são recentes as verificações de certas interdependencias, nesta esphera. Assim, admittia-se até ha pouco que plantas pertencentes a familias differentes não se podem unir em enxertia. Depois de ter o pesquisador russo KRENKE (9) apontado como erronea em principio essa affirmativa, tambem eu (24) verifiquei no anno passado, em uma serie de enxertias, que individuos de familias differentes se podem unir perfeitamente. Apparentemente, bem impressionante foi a enxertia de um crysanthemo em uma planta de Datura; Est. 7, fig. A do ponto de vista systematico merece porém especial attenção a enxertia de couve crespa sobre uma planta de Datura, (Est. 6) visto que as duas familias, Cruciferas e Solanaceas, a que pertencem as especies em questão, estão collocadas, no systema morphologico, bem afastadas uma da outra.

Essas experiencias com enxertos chegarão a ter talvez ainda maior importancia quando no futuro se passar a utilisar em maior escala pontos de vista chimicos para a classificação natural.

Não é nova idea de se substituir ou ampliar o modo de encarar o problema do ponto de vista puramente morphologico e serologico por um conceito baseado nas analogias chimicas. Já por muitas vezes foi chamada a attenção para o facto de possuirem determinadas familias

de plantas productos activos de seu metabolismo que as caracterisam (4, 14). Entre todas salientam-se as que encerram um grupo de substancias estimulantes e curativas utilisadas na medicina, os alcaloides. De accordo com a sua constituição chimica, podem-se dividir os alcaloides em diversos subgrupos, estando cada um delles ligado, em regra, a uma ou poucas familias de plantas, cujas affinidades systematicas correspondem ás affinidades chimicas dos alcaloides. Um bom exemplo de parallelismo entre a occurrencia de alcaloides e a affinidade natural offerece a familia das Solanaceas, da qual já citamos aqui varios representantes. Nessa familia existe uma serie de alcaloides, as tropeinas, que se distinguem por uma constituição chimica semelhante e effeitos physiologicos analogos. A esse grupo de alcaloides pertencem, além de um numero de substancias de menor importancia, a Atropina, a Hyosciamina e a Scopolamina.

Estes alcaloides são encontrados em quatro generos differentes, de alguns dos quaes provem o nome do alcaloide que contem (Atropa Belladona), Datura, Hyoscyamus e Scopolia.

As especies de Nicotiana, tambem pertencentes á familia das Solanaceas, as quaes, por caracteres morphologicos, se afastam dos generos acima referidos, não contêm alcaloides do grupo das Tropeinas, mas alcaloides nicotinicos, que se differenciam claramente das tropeinas pela sua constituição chimica.

Entretanto nas Labiates e Scrophulariaceas, familias de plantas que no systema estão mais proximas das Solanaceas, ou não se encontra alcaloide algum, ou somente alcaloide de constituição inteiramente differente. Torna-se portanto possivel, baseando-se somente no conteudo em alcaloides, separar não só o grupo das solanaceas de familias affins, mas tambem estabelecer dentro dessa familia uma distincção entre diversos generos e especies. E' verdade que tentativas desta natureza, de tomar a existencia de alcaloides para elemento auxiliar da systematica, só podem ter uma importancia limitada, visto que até agora só em poucas familias de plantas foram encontrados alcaloides. Recentemente CARLES (2), mostrava que, em alguns casos, os differentes generos duma familia se distinguem pela formula estructural dos assucares. Um pesquisador americano (17) procurou tambem remediar essa falta incluindo na systematica, além da distribuição dos alcaloides, a das gorduras, oleos ethereos e ceras. (1). A um systema dessa natureza, que é baseado na distribuição de grupos de substancias de natureza tão diversa, falta uniformidade e por esse motivo não pode de nenhuma forma ser preferido ao systema baseado nos cara-

(1) WEEVERS (30), num trabalho publicado em 1936, tambem acceitou, que o caracter «phytochimico» de uma especie é determinado por uma combinação de differentes substancias chimicas.

cteres morphologicos. Uma classificação de todas as formas de plantas, baseada em caracteres de natureza substancial, só poderia ser conseguida com o auxilio de um grupo de substancias que de facto estejam presentes em todas as plantas, que tenha papel preponderante na vida dellas e que facilmente apresente modalidades varias na estructura de sua molecula, permittindo uma relação de interdependencia entre estructura molecular e caracter de especie. O unico grupo de substancias ao qual podem ser attribuidas taes qualidades é o das proteinas, visto que as substancias fundamentaes do protoplasma não só existem em todas as cellulas vivas, como reunem um numero quasi incalculavel de representantes, dos quaes cada um parece ligado a determinada especie de planta. Algumas observações induzem a crer que, em geral, as estructuras das proteinas de duas especies de plantas tanto mais differem entre si, quanto mais divergem estas, do ponto de vista morphologico.

Porisso poderá a comparação da estructura das differentes especies de plantas servir para avaliar a affinidade natural dellas, de um ponto de vista unico, essencial e superior de um criterio substancial. Infelizmente a distincção das proteinas semelhantes, por processos puramente chimicos, ainda não é de todo possivel, ou só se alcança atravez de grandes difficuldades technicas. E' essa a razão pela qual se usam de preferencia os methodos serologicos para determinar pequenas differenças na estructura da proteina de plantas affins. Entretanto já se começou a empregar, para a differenciação de unidades systematicas maiores, tambem methodos puramente chimicos e chimico-enzymaticos, para o reconhecimento de substancias proteicas (12, 15). Seguindo-se este caminho, que me parece attrahente como terreno para futuras pesquizas systematicas, o methodo de enxertia conquistará um valor consideravel para a systematica botanica. Pois esse methodo nos offerece a possibilidade de observar a reciprocidade da influenciação de diversas especies de proteina em uma mesma planta.

Procurando agora avaliar comparativamente os prós e contras dos multiplos rumos tomados pelos trabalhos systematicos dos ultimos annos, somos levados a reconhecer que apezar das offensivas levadas a effeito contra o systema natural, baseado nos caracteres morphologicos, este continua firme nos seus fundamentos. Entretanto approxima-se o perigo de um desmoronamento á medida que se vão accumulando os progressos da chimica no terreno da analyse differencial das proteinas. Emquanto, pois, não fôr possivel caracterisar as differentes formas vegetaes por meio de um criterio substancial unico, parece mais razoavel, tambem por motivos praticos, conservar os actuaes limites das especies (28).

Talvez esta rapida resenha dos mais recentes methodos applicados no campo da systematica tenha conseguido mostrar que elle, que aos extranhos parece rigido e immutavel, foi arrastado inteiramente pela corrente de pesquizas biologicas, e longe de estar no fim do seu desenvolvimento, acha-se apenas em sua phase inicial.

Para mais completa informação sobre o assumpto, veja-se na bibliographia os n.os 1, 6, 10 e 18.

ZUSAMMENFASSUNG

Das System der Pflanzen, an dessen Ausbau die Wissenschaft schon seit Jahrhunderten arbeitet, verwirklicht nur eine der mannigfachen Möglichkeiten der Einteilung der verschiedenen Pflanzengruppen. Das System berücksichtigt im Wesentlichen nur die Eigenschaften formaler Natur, sieht also von den Unterschieden ab, die die einzelnen Organismen in ihrem stofflichen Aufbau erkennen lassen.

In der vorliegenden Abhandlung werden die Schwierigkeiten aufgezeigt, die dem morphologischen System durch die neuren Erkenntnisse der Ökologie und der Genetik erwachsen. Die Einheit des Systemes, die Art, kann nicht mehr wie zur Zeit der Schöpfung dieses Begriffes als eine klar umrissene und im Lauf der Zeiten unveränderliche Gruppe von Individuen aufgefasst werden. Vielmehr ist die Umgrenzung der «Art» in vielen Fällen willkürlich oder wenigstens mehr durch Herkommen als durch innere Notwendigkeit bedingt.

Angesichts dieser Schwierigkeiten verdienen die Versuche, die Unterschiede stofflicher Natur zwischen den Pflanzengruppen zum Aufbau eines Pflanzensystemes heranzuziehen besonderes Interesse. Derartige Unterschiede stofflicher Natur lassen sich mit den Hilfsmitteln der Serologie und mit denen der Chemie zwischen den einzelnen Pflanzengruppen ermitteln. Das serodiagnostische System, das namentlich von MEZ *(13, 14) und seiner Schule aufgebaut wurde, hat sich bisher keine unumstrittene Anerkennung zu erringen vermocht. Doch werden zur Zeit von* MORITZ *(16) u. a. aussichtsreiche Versuche zum Ausbau der Methodik angestellt.*

Recht bemerkenswerte Fortschritte haben auch die neueren Versuche gezeitigt, Unterschiede chemischer Art zwischen einzelnen Gattungen und species der Einteilung dieser Gruppen zu Grunde zu legen. Erwähnt sei hier vor allem die ausführliche Untersuchung von CARLES *(2) in der gezeigt wird, dass die Unterfamilien der Irideen Kohlehydrate verschiedener chemischer Struktur aufspeichern und auf Grund dieses Merkmals sich klarer voneinander trennen lassen als auf Grund morphologischer Charaktere. Freilich werden derartige Einteilungsversuche*

stets nur für beschränkte Gruppen des Pflanzenreiches Geltung besitzen, solange sie nicht auf Unterschieden der Struktur der Proteine aufgebaut sind. Denn nach unseren bisherigen Kenntnissen weist nur die Gruppe der Eiweissstoffe gleichzeitig eine solch grosse Zahl verschiedener Repräsentanten und einen derartigen Verteilungsmodus auf, dass tatsächlich mit dem Fortschritt der Methodik die Aussicht besteht, einmal jeder Pflanzenart einen oder mehrere «artspezifische» Vertreter dieser Gruppe zuordnen zu können. Die Schwierigkeiten, die sich dem Versuch in den Weg stellen, die Unterschiede der Eiweisstruktur bei den einzelnen Arten dem Dienste der Systematik nutzbar zu machen, liegen vor allem auf analytischem Gebiet. Viele Eiweisstofffe verwandten Baus können nämlich bisher mit chemischen Methoden noch nicht scharf voneinander getrennt werden.

Immerhin hat man, wie in der Zoologie (12), so auch in der Botanik bereits begonnen, die Eiweisstoffe einander nahestehender Arten (z. B. Tabak u. Tomaten) vergleichend zu untersuchen. In der vorliegenden Skizze wird darauf hingewiesen, dass bei derartigen Untersuchungen Pfropfungen aus artfremden oder sogar familienfremden Partnern wertvolle Dienste leisten können. Da aber all diese Wege einer experimentellen Systematik bisher noch nicht weit genug verfolgt sind, empfiehlt es sich vorläufig an dem bisherigen morphologischen Einteilungsprinzip und den bisherigen Artgrenzen festzuhalten.

BIBLIOGRAPHIA

1 — Caatrecasas, J. — 1934 — Die Chemische Zusammensetzung in der Pflanzensystematik. An. Asoc. españ. Progr. Ci., **1**, 92-97.

2 — Carles, I. — 1935 — Chimisme et classification chez les iris. Rev. gén. Bot., **47**, Janvier à Juin.

3 — Faegri, K. — 1935 — The Species Problem. Nature, **136**, 954.

4 — Hannig, E. — 1929 — Über experimentelle Systematik der Blütenpflanzen. Sitzungsber. a. Med.-Naturw. Gesellschaft Münster.

5 — Hannig, E. und Slatmann, W. — 1928 — Phytoserologische Untersuchungen **1**, Planta 5, 135-160.

6 — Harms, I. W. — 1934 — Wandlungen des Artgefüges. Tübingen.

7 — Hawkins, H. L., — 1935 — The Species Problem. Nature, **136**, 574.

8 — Kostoff, D. — 1929 — Acquired immunity in plants. Genetics **14**, 37-77.

9 — Krenke, Moritz und Busch — 1935 — Wundkompensation, Transplantation und Chimaeren bei Pflanzen. Springer.

10 — Kühn, A. — 1935 — Physiologie der Vererbung und Artumwandlung. Die Naturwissensch., **23**, 1-10.

11 — Link, G. K. K. — 1933 — Precipitin-Ring test applied to fungi II. The Botanical Gazette, **45**, 1-33.

12 — Lissitzin, M. A. und Alexandrowskaja, N. S. — 1935 — Über die chemische Zusammensetzung der Störprotamine, Hoppe-Seyler, Zsch. f. phys. Chemie, **54**, 238.

13 — MEZ, C. — 1922 — Anleitung zu serodiagnostischen Untersuchungen für Botaniker. Botanisches Archiv, **1**, 177-200.
14 — MEZ, C. — 1926 — Die Bedeutung der Serodiagnostik für die stammesgeschichtliche Forschung. Bot. Archiv, **16**, 1-23.
15 — MOLISCH, H. — 1933 — Pflanzenchemie und Pflanzenverwandtschaft. Jena, Fischer.
16 — MORITZ, O. — 1932 — Prinzipien und Beispiele der Anwendung phytoserologischer Methodik, Planta **15**, 647-696.
17 — MACNAIR, I. B. — 1934 — The evolutionary status of plant families in relation to some chemical properties. American Journal of Botany **21**, 426-451.
18 — RENSCH, B. — 1929 — Das Prinzip geographischer Rassenkreise und das Problem der Artbildung. Bornträger.
19 — SCHARFETTER-SCHMUT. — 1932 — Lehrbuch der Botanik für Mittelschulen. Deuticke.
20 — SILBERSCHMIDT, K. — 1931 — Studien zum Nachweis von Antikörpern in Pflanzen **I**, Planta **13**, 114-168.
21 — SILBERSCHMIDT, K. — 1932 — Studien zum Nachweis von Antikörpern in Pflanzen **II**, Planta **17**, 493-589.
22 — SILBERSCHMIDT, K. — 1933 — Beiträge zur Stoffwechselgemeinschaft zwischen Pfropfpartnern, Planta **19**, 730.
23 — SILBERSCHMIDT, K. — 1934 — Weitere Versuche über die Verteilung von N-Substanzen in Pfropfungen und Stecklingen, Planta **22**, 313.
24 — SILBERSCHMIDT, K. — 1935 — Die Abhängigkeit des Pfropferfolges von der systematischen Verwandtschaft der Partner. Zsch. f. Bot., **29**, 66-167.
25 — SIRKS, M. I. — 1935 — Der genetische Artbegriff. Vakbl. Biolog., **16**, 199-206.
26 — TURESSON, G. — 1929 — Zur Natur und Begrenzung der Arteinheiten. Hereditas, 12.
27 — TURESSON, G. — 1930 — Genecological Units and their classificatory value. Svensk Botanisk Tidskrift, **24**, Cad. 4.
28 — TURRIL, W. B. — 1936 — Contacts between Plant Classification and Experimental Botany. Nature, 3466, Vol. 137.
29 — TUZSON, I. von — 1936 — Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Monocotylen. Proceed. of the VI Intern. Congr. of Bot., **1**, 324.
30 — WEEVERS TH. — 1936 — A consideration of some phytochemical problems, Koninklijke Akademie van Wetenschappen, Amsterdam, Proceedings, **39**, 757-761.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 6

Enxertia de *Brassica oleracea* sobre *Datura stramonium*.

Estampa 7

Fig. A — Enxertia de *Chrysanthemum annuum* sobre *Datura stramonium*.
Fig. B — Enxertia de *Zinnia elegans* sobre *Datura stramonium*.

B

A

ALGUNS DETALHES SOBRE A COLORAÇÃO DE CÓRTES HISTOLOGICOS

COM A SOLUÇÃO AZUR-AZUL-EOSINA DE MEYER

POR

P. R. de Souza

Trabalho do Instituto Biologico de S. Paulo

Devido á difficuldade geralmente encontrada na pratica para se obterem, em córtes histologicos, boas colorações de GIEMSA apresentando o effeito ROMANOWSKY, e dada a falta de dados a esse respeito nos livros de technica de laboratorio, fomos levados a fazer varios ensaios considerando alguns pontos que nos pareciam de importancia e que, por mostrarem uma decidida influencia sobre o methodo, motivaram a presente publicação relativa ao emprego de um corante de MEYER (Arch. Inst. Biologico VI. 1935, p. 97) com as mesmas propriedades que o de GIEMSA.

Os pontos considerados neste trabalho foram os seguintes:

a) Influencia do acido acetico no fixador de ZENKER.
b) » - da espessura dos fragmentos collocados no fixador.
c) Tempo de fixação.
d) Tempo de coloração.

Para verificar os 3 primeiros pontos realizámos a seguinte experiencia:

De uma cobaya recem sacrificada retirámos pedaços de figado, rins, baço e pulmões, cujos fragmentos, de espessuras variadas, reunidos em grupos designados por letras, foram collocados respectivamente em liquido de ZENKER sem acido e com acido, durante periodos diversos, como se vê no quadro n.º 1. Após lavagem em agua corrente foi feita a deshydratação em alcooes ligeiramente alcalinos á phenolphtaleina e inclusão em parafina segundo a technica commum. Um cuidado muito especial consistiu em se fazer a coloração em uma solução preparada com 1 gotta do corante para 1 cc. de agua tamponada, de pH = 7,2 segundo a recommendação de WEISS. Uma vez corados, os cortes eram differenciados em acetona ligeiramente alcalinizada pelo breu, deshydratado em misturas acetona-xylol até xylol puro, tendo-se o cuidado de empregar, depois da differenciação, varios frascos com misturas de acetona e xylol, perfeitamente neutros. Os cortes foram corados durante 24 horas. Os resultados são os que se vêem no seguinte quadro:

QUADRO N.º 1

Influencia da presença de acido, espessura dos fragmentos e tempo de fixação pelo Zenker, na coloração de Giemsa.

Material	Espessura dos pedaços	Fixador	Tempo de fixação	Resultados da coloração		
				Nucleos	Cytoplasma	Differença entre a peripheria e o centro dos córtes
A	2 mms.	Zenker sem acido	18 horas	Violaceos	Azues	—
B	5 mms.					±
C	10 mms.					+
D	2 mms.		48 horas			—
E	5 mms.					±
F	10 mms.					+
G	2 mms.	Zenker com 10% de acido acetico	18 horas	Azues	Roseos	—
H	5 mms.					—
I	10 mms.					—
J	2 mms.		48 horas			—
K	5 mms.					—
L	10 mms-					—

A experiencia foi repetida com identicos resultados.

Para verificar a influencia do tempo de coloração, foi feita a seguinte experiencia:

Numerosos pedaços de casos de leucose foram fixados em ZENKER sem acido. O material foi incluido em parafina, cortado e tratado segundo a technica usual. A coloração foi feita em solução de azur-azul-eosina, na proporção de 1 gotta por cc. de agua tamponada com p H = 7,2, durante tempos variaveis, como adiante se vê. Differenciação em acetona ligeiramente alcalinizada pela solução de breu, segundo J. R. MEYER (loc. cit.).

Os resultados podem-se vêr no quadro abaixo:

QUADRO N.º 2

Influencia do tempo de coloração sobre o matiz dos nucleos e do protoplasma.

Grupos	Tempo de coloração	Resultados	
		Nucleos	Protopl.
1.º	1 hora	A	R
2.º	6 horas	A	R
3.º	15 horas	AV	R
4.º	24 horas	V	R

A = Azul; R = Roseo; AV = Azul, apparecendo já em alguns campos, um matiz avermelhado; V = Violeta.

Como se vê, a presença de acido acetico no fixador de ZENKER é nociva á coloração, impedindo a apparição do «effeito Romanowsky».

Quanto ao tamanho das peças, verifica-se que os cortes de fragmentos delgados (2 mms. de espessura) se apresentam bem corados e de maneira uniforme. Os cortes provenientes de peças maiores dão coloração na zona peripherica, mas o centro apresenta-se deficientemente corado.

Os resultados referidos no quadro n.º 2 mostram que o tempo de coloração tambem é factor de importancia para o bom exito do processo, delle tambem dependendo o matiz violeta que deve caracterizar os nucleos satisfactoriamente corados.

RESUMO

Para se obter o «effeito Romanowsky» na coloração de cortes histologicos é importante observar os seguintes detalhes:

1.º — Evitar a presença de acido acetico quando o liquido fixador é o de ZENKER;

2.º — Prolongar a fixação no liquido de ZENKER por mais de 18 horas;

3.º — Evitar que os fragmentos fixados no ZENKER tenham mais de 2 mms. de espessura;

4.º — Prolongar o tempo de coloração na solução de azur-azul-eosina (na proporção de 1 gotta por cc. de agua com p H = 7,2) por um periodo de cerca de 24 horas.

ABSTRACT

Some details on the staining of paraffin sections with a solution giving the same results as the Giemsa's stain.

Several series of experiments were carried out in order to test whether a number of factors exerted or not any influence on the results of staining tissues by a solution having the same properties as the GIEMSA'S *stain. Pieces of different sizes were hardened in* ZENKER'S *fluid, with or without acetic acid, and during various periods of time. Embedding was made in paraffin and sections stained by the above mentioned stain in a buffered solution having a pH concentration of about 7,2. The conditions displaying the more marked unfavorable effects on the final results were: presence of acetic acid in* ZENKER'S *fluid, an incomplete hardening occurring when fixation was shorter than 18 hours and the size of the pieces put in* ZENKER'S *fluid when it was larger than 2 millimeters in thickness. Finally, the results were quite unfavorable if the period of time during which the buffered staining solution acted upon the sections was shorter than one of 24 hours.*

SOBRE A QUESTÃO DA CONVERSIBILIDADE DOS ESTREPTOCOCCOS ENVERDESCENTES EM HEMOLYTICOS

POR

O. Bier

Trabalho do Instituto Biologico de S. Paulo

Com estampa 8

Encontram-se na litteratura (1) numerosos dados referentes á conversão dos estreptococcos hemolyticos em verdes, desde os trabalhos já antigos de Rosenow (1914), que referem a possibilidade de transformar estreptococcos hemolyticos em estreptococcos enverdescentes, com o auxilio de technicas varias, como a cultura em agar glycosado em atmosphera de oxygenio, o crescimento symbiotico com o *B. subtilis*, a vegetação em meios hypertonicos, etc.

Kuczynski e Wolff (1920-21) ampliaram e confirmaram essas verificações, introduzindo uma nova technica para conseguir a conversão de estreptococcos hemolyticos em verdes, a saber, a de inocular a cultura em camondongo e reisolál-a dos orgãos internos, em particular do pulmão, algumas horas depois da inoculação.

Os resultados dessa technica foram confirmados a seguir por uma serie de pesquisadores, como Schnitzer & Munter, Hubert, Hintze & Kühne, Nakamura, etc.

Recentemente (1928), Todd confirma esse facto e accentúa que a perda do poder hemolytico obtida pela passagem em camondongo é reversivel, podendo-se recuperar a forma hemolytica mediante repetidas subculturas em meios artificiaes; por vezes é necessario um grande numero de subculturas em caldo (150), para se obter a actividade hemolytica original.

A variação *S. hæmolyticus* → *S. viridans* tem sido igualmente obtido *in vitro*, por meios chimicos, como o *Rivanol* e a *Eukupin (Morgenroth* e col.), a *acridina* (Deicher), pela cultura em urina (Braun), etc.

Valentine & Krumwiede (1921) observaram mesmo uma «dissociação espontanea» em u'a amostra de estreptococco hemolytico que depois de cultivada repetidamente durante dois annos, apresentou bruscamente um phenomeno de dissociação, dando cerca de 10 % de colonias verdes entre as colonias «beta» typicas.

Grinnel (1928) pôde observar essa dissociação em cultura de estreptococco hemolytico proveniente de uma cellula só.

(1) Excellente resumo e discussão desse thema acha-se em Lehmann, W, Erg. Hyg. Bakt. Immunitätsf. u. exp. ther. 11, 301-322 (1930).

Si nos reportarmos, porém, á variação inversa: *S. viridans* → *S. hæmolyticus,* verificaremos que são ainda escassos e duvidosos os dados existentes na litteratura.

Rosenow (1914) refere a conversão de um estreptococco verde em hemolytico pela cultura em agar-ascite glycosado numa atmosphera de oxygenio, por subculturas repetidas em agar-sangue durante um anno, etc. Do mesmo modo, Schnitzer e Pulvermacher (1921) affirmam tambem ter conseguido transformar estreptococcos verdes em hemolyticos mediante passagens successivas em animal ou por subcultura repetida.

Taes verificações foram, porém, contestadas por Heim e Schlirf e não podem ser consideradas como factos adquiridos.

No presente trabalho, referiremos observações feitas em u'a amostra de estreptococco que apresentou um phenomeno de «dissociação espontanea» no sentido *viridans* → *hæmolyticus,* com a peculiaridade de ser essa dissociação nitidamente reforçada sob a influencia do bacteriophago especifico.

A amostra em questão foi por nós obtida da colecção de culturas do Instituto Bacteriologico de São Paulo («St. haem. 398», isolado do liquido cephalo-racheano, de um caso de meningite), graças á cortezia do Prof. C. Lima.

Dissociação observada na amostra «St. haem. 398».

A amostra «*St. haem. 398*» é de um estreptococco hemolytico, pois semeada em caldo-sôro produz hemolysina facilmente evidenciada.

Todavia, semeada em agar simples, pH 7.4, addicionado de 5 % de sangue de carneiro, desenvolve quase exclusivamente colonias de typo alpha.

Observando-se cuidadosamente as placas, nota-se, porém, em algumas dellas, quando o espalhamento da cultura é bem feito, que, no meio de numerosas colonias alpha, existem 1 ou 2 colonias beta typicas.

Pensando, a principio, que se tratasse de uma cultura mixta, procedemos ao reisolamento, em placa, de uma colonia alpha e de uma colonia beta.

Após 10 passagens successivas em placa, verificamos: 1.º que a «variante» beta é pura, isto é, desde a 1.ª passagem dá logar apenas ao desenvolvimento de colonias hemolyticas — 2.º que a «variante» alpha, mesmo após 10 reisolamentos successivos, continúa sempre a produzir uma pequena porcentagem de colonias «beta» entre as numerosas colonias alpha.

Essa persistencia do phenomeno, após successivas purificações em placa, leva a crer que se trata realmente de um phenomeno de dissociação. Argumentos addicionaes em favor desta idéa são fornecidos pelos factos que serão referidos a seguir.

Reforço da dissociação da amostra «St. haem. 398 sob a influencia do bacteriophago especifico.

A cultura de uma colonia alpha foi semeada em 2 tubos contendo 10 cc. de caldo-infuso de figado, a um dos quaes se addicionou 1 cc. de bacteriophago estreptococcico (proveniente do laboratorio do Prof. SCHLESINGER, Inst. Rob. Koch, Berlim).

Após 24 horas, notava-se turvação e pequeno deposito no tubo, sem bacteriophago e lyse completa no tubo contendo bacteriophago.

Quarenta e oito horas depois, entretanto, notava-se no tubo, que antes continha cultura totalmente lysada, o desenvolvimento de uma cultura secundaria sedimentada e de aspecto grumoso.

As apparencias do tubo controle (sem phago) e da cultura secundaria lembram as culturas, em caldo, das variantes S e R.

Identica verificação foi feita com cultura proveniente de uma colonia beta, tendo-se verificado que esta variante é completamente insensivel ao estreptophago.

Passando-se novamente em placa o conteúdo do tubo A — cultura secundaria da variante alpha + estreptophago e o do tubo B — cultura normal da variante alpha sem phago, verificou-se o seguinte facto muito suggestivo:

1.º — A cultura normal produz, como já foi accentuado, quase exclusivamente colonias verdes e uma porcentagem pequena (cerca de 1 %) de colonias beta.

2.º — A cultura secundaria obtida sob a acção do estreptophago apresenta uma inversão nas proporções relativas de colonias verdes e hemolyticas, havendo predominio destas ultimas (cerca de 80 %).

Ha, pois, um nitido reforço da dissociação espontanea da amostra «St. haem. 398» sob a influencia do bacteriophago especifico.

Procuramos obtêr o mesmo resultado por meio de semeaduras repetidas em caldo addicionado de chloreto de lithio, frequentemente usado como incitante da variação bacteriana, porém os resultados foram completamente negativos após 5 passagens.

Producção de hemolysina em caldo pelas variantes alpha e beta.

Procuramos tambem verificar si havia differença entre as variantes alpha e beta relativamente á producção de hemolysina em tubo.

Os resultados obtidos com filtrados de cultura de 16 hs. em caldo sôro (1 cc. de varias diluições de filtrado + 1 cc. de globulos lavados de carneiro a 5 %) estão consignados na tab. 1.

TABELLA 1

Producção de hemolysina em caldo-sôro pelas variante alpha e beta de «St. haem. 398».

Variantes	Quantidades decresc. de filtrado				
	40	0,56	0,32	0,18	0,1
Beta	Ht	Ht	Ht	Ht	Hqt
Alpha	0	0	0	0	0

Ht. Hem. total; Hqt. Hem. quase total; 0. Hem. nulla.

Influencia da exclusão de oxygenio sobre a hemolyse em placa pela amostra «St. haem. 398».

Já em 1912, THALMANN, BENTHIN e outros fizeram notar que certos estreptococcos enverdescentes davam colonias typicamente hemolyticas quando cultivadas em ambiente de tensão reduzida de oxygenio. Mais recentemente (1928), TODD comprovou esse facto com toda a precisão em uma amostra «viridans», obtida a partir de colonia hemolytica «matt», mediante passagens successivas em camondongo.

Pareceu-nos de interesse verificar si a amostra «St. haem. 398» que em agar-sangue de carneiro, em presença do ar, produz quase exclusivamente colonias alpha, ao ser cultivada na ausencia de oxygenio, produziria colonias beta.

Realmente é o que succede: 4 placas de agar-sangue de carneiro foram semeadas com cultura em caldo-infuso de figado de 24 horas de «St. haem. 398»; 2 das placas foram incubadas em presença do ar e as 2 outras foram collocadas em uma jarra na qual se fez um vácuo de cerca de 600 mms. de Hg durante 15 minutos. Após 48 horas de incubação, as placas incubadas em presença do ar mostraram exclusivamente colonias verdes, ao passo que as culturas incubadas em anaerobiose apresentavam cêrca de 50 % de colonias verdes e 50 % de colonias typicamente hemolyticas.

Discussão e interpretação dos resultados

As observações apresentadas neste trabalho mostram com toda a evidencia que os estreptococcos hemolyticos podem, em certas condições de cultura, apparecer como typicos estreptococcos enverdescentes, mostrando apenas uma pequena porcentagem de colonias beta.

Essa dissociação, que melhor se diria flutuação, é muito instavel e póde ser revertida parcialmente pela incubação anaerobica.

Occasionalmente se encontram amostras que apresentam espontaneamente essa dissociação, ora com predominio da «variante» hemolytica (VALENTINE & KRUMWIEDE, 1921), ora com predominio da phase enverdescente (BIER, 1935).

Ao facto, comprovado por numerosos autores, da variação no sentido *hemolyticus* → *viridans* pela passagem em camondongo, addicionamos a verificação de que o bacteriophago especifico é reactivo particularmente apropriado para incitar a variação em sentido inverso.

E' difficil interpretar o mechanismo da acção do estreptophago no reforçamento dessa dissociação.

Baseado no «effeito hemolytico» descripto por SONNENSCHEIN (que a combinação «St. haem. 398» + estreptophago exhibe com muita nitidez) e no facto das amostras hemolyticas de enterococco apresentarem «Flatterformen», em contraposição ás amostras anhemolyticas, GRUMBACH suggere que a maioria das variações entre os estreptococcos se relacionem com a presença do bacteriophago.

Nessa ordem de idéas, a variante hemolytica poderia ser considerada como u'a amostra resistente e lysogenica. Todavia, a observação da morphologia das colonias comparativamente, nas variantes alpha e beta, de «St. haem. 398» não nos levou á convicção de uma differença apreciavel, nem da existencia de «Flatterformen»; tambem não nos foi possivel isolar nenhum principio lytico das culturas, em caldo, da variante hemolytica.

Uma possibilidade de interpretação do mechanismo do reforço da dissociação *Viridans* → *hæmolyticus* produzida pelo phago é o facto das culturas secundarias que vegetam após a lyse pelo bacteriophago apresentarem frequentemente importantes modificações das propriedades biochimicas da especie.

NOBREGA, em nosso laboratorio, obteve, sob a acção do bacteriophago, uma variante de *b. de Shiga* productora de catalase.

E' possivel, pois, que sob a acção do bacteriophago, se tenha gerado da amostra «St. haem. 398» uma variante com modificação do metabolismo respiratorio, no sentido de uma formação mais escassa de peroxydo.

Ora, como demonstrou TODD (1928), a producção de peroxydo, e a de hemolysina variam em sentido inverso: embora a hemolysina não seja destruida pela $H_2 O_2$, a concomitancia do apparecimento da hemolysina com o desapparecimento do peroxydo mostra que elles dependem de uma causa commum ainda indeterminada.

CONCLUSÕES

1. — Em certas condições de cultura, os estreptococcos hemolyticos podem apresentar uma dissociação de colonias alpha e colonias beta, com predominio de uma ou de outra phase.

2. — Essa dissociação póde ser incrementada no sentido *hæmolyticus → viridans* por meio da passagem em camondongo (KUCZYNSKI & WOLFF, 1921) e em sentido inverso á custa do bacteriophago especifico (BIER, 1935).

3. — Taes phenomenos estão provavelmente relacionadas com modificações temporarias do metabolismo bacteriano que induzem fluctuações correspondentes da producção de hemolysina.

ABSTRACT

1. — Under the influence of certain culture conditions, the hæmolytic streptococci may present a dissociation of colonies alpha and beta, with predominance of either one or the other phase.

2. — This dissociation phenomenon may be reforced in the sense «hemolytic-viridans» by means of serial passage through mouse (KUCZYNSKI & WOLFF, *1921) or in reverse sense thorough the action of specific phage.* (BIER, *1935).*

3. — These facts are probably related to temporary modifications of the bacterial metabolism which induce correspondent fluctuations of the hæmolysin production.

BIBLIOGRAPHIA

1 — BIER, O. — 1935 — Influence du bactériophage streptococcique sur la dissociation d'un échantillon de streptocoque, par rapport á la transformation de l'hémolyse alpha en béta. Compt. rend. Soc. Biol., **120,** 172-173.

2 — GRUMBACH, A. — 1932 — Beitrag zur Frage des Hämolyseeffektes. Grundsätzliches zur Bakterienvariabilität. Zentralbl. f. Bakt., **127,** 351-357.

3 — THOMSON, D. & THOMSON, R. — 1927 — Mutation and variability amongst the Streptococci An. Pickett. Thomson Res. Lab., **3,** 191-208.

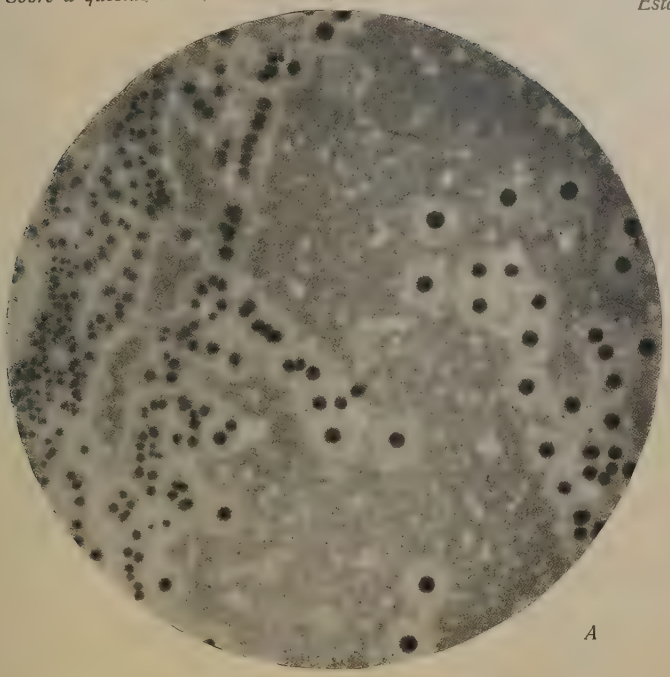
4 — TODD, E. W. — 1928 — The conversion of hemolytic streptococci to non hemolytic forms. Journ. exp. med., **48,** 493-511.

5 — VALENTINE, E. & KRUMWIEDE, CH. — 1927 — The Loss of Hemolytic Capacity by a Fraction of a Culture of a Hemolytic Streptococcus without change in Agglutination Characteristics. Journ. exp. med., **36,** 157-162.

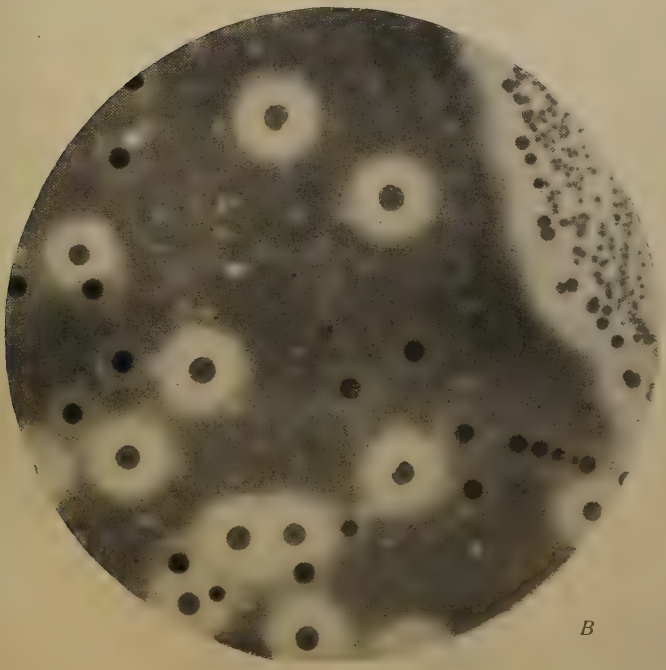
EXPLICAÇÃO DA ESTAMPA 8

Fig. A — Placa de agar-sangue semeada com 1 gotta de cultura de 48 hs. em caldo-infuso de figado da amostra «St. 398». Augmento: 1,5 ×.

Fig. B — Placa de agar-sangue semeada com 1 gotta de cultura secundaria desenvolvida após 48 hs. em caldo-infuso de figado semeado com «St. 398» e addicionado de bacteriophago estreptococcico. Augmento: 1,5 ×.



A



B

AMOSTRAS ATYPICAS DE "SALMONELLA PULLORUM"

POR

P. Nobrega

Trabalho do Instituto Biologico de S. Paulo

Sob o ponto de vista pratico tem grande importancia a differenciação exacta entre *S. pullorum* e *S. gallinarum*. Estes organismos são responsaveis por duas doenças de aves muito disseminadas neste Estado, respectivamente a pullorose e o typho aviario, cuja prophylaxia apresenta muitos pontos de contacto e por outro lado, caracteristicas particulares que requerem applicação immediata desta ou daquella medida segundo o caso considerado. Com effeito, o problema essencial na erradiação da pullorose doença essencialmente transmittida atravez do ovo e com cyclo perfeitamente estabelecido, é a pesquiza e eliminação systematica da ave adulta portadora; diante do isolamento da *S. pullorum* de ovo pinto ou adulto, impõe-se logo uma medida fundamental nas granjas de reproducção: exame systematico de todas as aves adultas quanto á presença de agglutininas para *S. pullorum* e eliminação de todos os individuos que reagem positivamente. No caso do typho aviario, o problema é menos complexo; é verdade que, embora muito raramente, (ainda não observamos um unico caso em S. Paulo) a *S. gallinarum* se transmitte pelo ovo, o que justifica o facto de se indicar tambem o exame do sangue para a pesquiza de possiveis portadores com localisação do germen no ovario; ao lado disso entretanto, temos na luta contra o typho aviario um elemento de grande valor, qual seja o emprego de vaccinas preventivas, de preferencia autogenas. Esta medida prophylactica que simplifica grandemente o problema do typho aviario é completamente inefficaz na luta contra a pullorose.

A distincção entre *S. pullorum* e *S. gallinarum* é baseada num conjuncto de caracteres cujo valor relativo analysamos em artigo recente (4) trabalhando com 65 amostras de *S. pullorum* e 30 de *S. gallinarum* isoladas no Instituto Biologico, as primeiras de pintos, ovos e aves adultas, as segundas de casos typicos de typho aviario em gallinhas adultas. Verificamos então que por meio de bacteriophago convenientemente adaptado é possivel fazer-se uma distincção entre os dois germens em 98,94 % dos casos. A lyse da *S. pullorum* e a resistencia da *S. gallinarum* constituem assim um dos melhores criterios de differenciação entre os dois organismos.

A acidificação de meios organicos constitue tambem um criterio differencial importante; assim de accordo com as observações de MALLMANN (3) e KAUFFMANN (2) a *S. gallinarum* acidifica sempre um meio contendo dextro-tartarato ao passo que a acção da *S. pullorum* é sempre negativa. Trabalhando com o meio de JORDAN (1) verificamos egualmente que todas as nossas amostras de *S. pullorum* não produzem alteração do meio que é, pelo contrario, acidificado por todas as amostras de *S. gallinarum*.

Recentemente, PACHECO e RODRIGUES (5) descrevem no «grupo *pullorum-gallinarum*» um novo representante a que denominam typo *intermedius*, assim chamado porque dum lado se approxima da *S. gallinarum* pelas propriedades morphologicas e fermentação da dulcita e maltose e de outro se comporta como a *S. pullorum* na fermentação positiva de sorbita e acção negativa sobre o meio de JORDAN. Além disso não fermenta a xilose ao contrario da *S. pullorum* e *S. gallinarum* que apresentam reacção positiva. Os autores verificam ainda que todos estes organismos são identicos sob o ponto de vista sorologico.

Tivemos occasião de estudar 10 dessas amostras e confirmamos sob o ponto de vista cultural e morphologico as observações de PACHECO e RODRIGUES; verificamos ainda que todas ellas são completamente lysadas pelo bacteriophago em diluições variaveis de 10^{-4} a 10^{-5}, comportando-se assim em relação ao agente lytico como a *S. pullorum*. Este facto alliado á acção negativa sobre o dextro-tartarato nos leva a admittir que todas as amostras que constituem o typo «intermedius» de PACHECO e RODRIGUES devem ser consideradas como *S. pullorum* pelas seguintes razões:

a) São sensiveis á acção do bacteriophago que lysa 98,94 % das nossas 65 amostras de *S. pullorum* e 0 % das nossas amostras de *S. gallinarum;*

b) Não acidificam o dextro-tartarato, comportando-se sob este ponto de vista como todas as amostras de *S. pullorum;*

c) Embora sob o ponto de vista da fermentação dos assucares estas amostras não apresentem as propriedades habituaes da *S. pullorum*, o facto não tem importancia fundamental pois este criterio é muito menos constante que os dois anteriores; o seguinte quadro mostra com effeito que as caracteristicas differenciaes mais constantes da *S. pullorum* são a sensibilidade do bacteriophago e a não acidificação do dextro-tartarato:

	N.º de amost.	Bacterio-phago		Dextro-tartarato		Maltose		Dulcita		Leite tor-nasolado		Gaz		Xilose		Sorbita	
		+	−	+	−	+	−	+	−	A	AK	+	−	+	−	+	−
S. pullorum. .	65	64	1	0	65	5	60	3	62	62	3	13	52	61	4	16	49
S. gallinarum	30	0	30	30	0	26	4	30	0	3	27	0	30	30	0	0	30

CONCLUSÕES

Os criterios mais importantes para a differenciação de *S. pullorum* e *S. gallinarum* são a sensibilidade ao bacteriophago e a acção sobre o dextro-tartarato.

As amostras descriptas por PACHECO e RODRIGUES no grupo *pullorum-gallinarum* como typo *intermedius* devem ser consideradas como amostras atypicas de *S. pullorum.*

RÉSUMÉ

Recémment PACHECO *et* RODRIGUES *ont décrit sous la denomination de «type intermedius» un nouveau representant du groupe pullorum-gallinarum qui s'approche de S. pullorum en ce qu'il fait fermenter la sorbite et qu'il ne pousse pas sur le milieu de Jordan; il se comporte par contre, comme S. gallinarum par ses caractères morphologiques et parce qu'il fait fermenter la dulcite et le maltose. En plus, ce germe ne fait pas fermenter la xylose, tandis que S. pullorum e S. gallinarum font fermenter ce milieu.*

Il nous a até donné d'etudier 10 de ces souches qui constituent le type intermedius. Nous croyons qu'elles doivent etre considerées comme appartenant à S. pullorum, par les raisons suivantes:

a — Elles sont sensibles à l'action du bacteriophage, qui, comme nous l'avons vu lyse 98.94% de nos souches typiques de S. pullorum et 0% de nos 30 souches de S. gallinarum.

b — Elles n'acidifient pas le dextro-tartrate, et en celá elles se comportent comme toutes les souches de S. pullorum.

c — Il est vrai que en ce qui concerne la capacité de faire fermenter les sucres, les souches de PACHECO *et* RODRIGUES *ne se comportent pas comme des souches typiques de S. pullorum. Cette constatation ne nous semble pas d'une importance essentielle, car il s'agit d'un caractère moins constant que les deux autres que avons mentionné. Le tableau ci joint montre d'ailleurs, que les caractères differentiels les plus constants de S. pullorum son la sensibilité à l'action du bacteriophage et la non acidification du dextro-tartrate.*

BIBLIOGRAPHIA

1 — JORDAN, E. O. e HARMON, P. H. — 1928 — New differencial medium for paratyphoid group, Journ. Inf. Dis., **42**, 238-241.

2 — KAUFFMANN, E. — 1934 — Untersuchungen über die *gallinarum* - Stämme., Zent. f. Bakt., I. O., **132**, 337-442.

3 — MALLMANN, W. L. — 1931 — Use of organic acids for the differentiation of *Salmonella pullorum* and *Salmonella gallinarum*. Proc. Soc. Exp. Biol., a. Med., **28**, 501-502.

4 — NOBREGA, P. — 1935 — Differenciação entre *S. pullorum* e *S. gallinarum*. Papel importante do bacteriophago. Arch. Inst. Biologico, **6**, 71-84.

5 — PACHECO, G. e RODRIGUES, C. — 1935 — Nouveau représentant des bactéries de groupe *pullorum-gallinarum*. Morphologie des colonies du groupe. C. R. S. Biol., CXVIII, **9**, 905-907.

———o———

RELATORIO SOBRE UMA INVESTIGAÇÃO PRELIMINAR "LIMNOLOGIA DAS AGUAS DE SÃO PAULO"

APRESENTADO AO EXM.º SR. SECRETARIO DA AGRICULTURA DO ESTADO DE SÃO PAULO

PELO

Dr. Stillman Wright

Trabalho em collaboração do Instituto Biologico de S. Paulo com a Commissão Technica de Piscicultura do Nordeste

Durante os mezes de Outubro, Novembro e Dezembro de 1935, o autor fez um estudo preliminar da limnologia de 45 aguas situadas na parte oriental do Estado de São Paulo. Tendo em vista que não dispunhamos de apparelhamento necessario, pois com excepção de 3 aguas, nos vimos obrigados a trabalhar sem bote e que, além disso, as aguas foram visitadas uma só vez, era de prever que o trabalho não poderia levar-nos a conclusões mais amplas.

Comtudo foi assignalado um conjuncto de caracteres interessantes, que a seguir apresentamos.

E' preciso assignalar que em São Paulo as aguas soffrem accentuadas modificações, de accordo com o clima e as estações e por isso é provavel que as variações, nos caracteristicos physicos, chimicos e biologicos dessas aguas, sejam correspondentes ás estações. Para adquirir conhecimentos limnologicos aproveitaveis, a investigação deveria ser levada a effeito pelo menos durante um anno completo.

Confessamo-nos gratos pelo auxilio que de varias formas nos foi prestado por diversas pessoas. A opportunidade para realizar este estudo foi devida á iniciativa do Dr. R. v. Ihering, Chefe da Commissão Technica de Piscicultura do Nordeste, que obteve auxilio financeiro e cooperação do Sr. Secretario da Agricultura do Estado de São Paulo, Dr. J. T. Piza Sobrinho.

A comparticipação do Instituto Biologico do Estado de São Paulo, foi devida á amavel interferencia do Prof. H. da Rocha Lima, seu Director Superintendente e do Dr. J. R. Meyer, Sub-Director da Divisão Animal. Os Srs. A. W. R. Billings e Felix Charlier, da Administração da S. Paulo Light and Power Company, facilitaram o exame das grandes represas dessa Companhia, nas melhores condições de trabalho. As aguas da cidade de Amparo foram visitadas emquanto fomos hospedes do Dr. Pedro de Azevedo; e nas proximidades de Campinas auxiliou-nos o Dr. Candido de Moraes. E'-nos grato assignalar nosso reconhecimento a essas e outras pessoas que contribuiram para tornar proveitosa esta serie de investigações.

Grandes reservatorios dos arredores de S. Paulo.

Reservatorio do Rio Grande:

E' o maior dos reservatorios de São Paulo. Cobre uma area de cerca de 130 kms. quadrados, tendo uma capacidade de 1 bilhão e 300 milhões de metros cubicos.

A forma da bacia é muito irregular, apresentando numerosos braços estreitos que derivam do conjuncto principal. Em 16 de Outubro de 1935 fizemos observações junto á barragem conhecida pelo nome de Pedreira, bem como no chamado Rio Pequeno, perto da extremidade opposta á barragem.

No trecho da Pedreira a agua mostrava-se turva, com aspecto um tanto leitoso, devido a um fino sedimento em suspensão. Os crustaceos do plancton eram pouco abundantes, mas mesmo assim colheram-se alguns exemplares de *Diaptomus, Cyclops* e *Cladoceros*. Numa profundidade de pouco menos de 12 ms. observaram-se os seguintes resultados:

TABELLA I

Profund. metros	Temp.	Oxygenio	CO_2	pH	$CaCO_3$
0	19.8.º C	7.4	+ 2	< 6.8	17
12	18.2	6.4	+ 2.5	—	17

A pequena differença de temperatura entre a superficie e o fundo, mostra que não havia uma estratificação thermica definida, o que aliás se deprehende dos resultados chimicos, quando evidenciam uma taxa de oxygenio ligeiramente mais baixa junto ao fundo e nenhuma differença apreciavel no dioxydo de carbono livre. Contudo é preciso mencionar que a grande turvação da agua augmenta o numero de causas de erros usuaes para o caso da determinação do CO_2. Além disso, o pH, por ser inferior a 6,8, não era mensuravel com o apparelhamento commum. A alcalinidade ao methyl-orange, expressa em carbonato de calcio, era muito baixa, mostrando tratar-se de uma agua «leve».

Na zona do Rio Pequeno não havia turvação na agua, mas esta possuia uma coloração pardo-escura. Os crustaceos do plancton eram por muitas vezes mais abundantes que os da zona da Pedreira. A superficie da agua continha + 5 p. p. m. de CO_2 e 23 p. p. m. de $CaCO_3$; o pH, como em Pedreira, era inferior a 6,8.

Reservatorio de Guarapiranga:

As observações deste lago foram feitas em 18 de Outubro de 1935. Cobre elle uma area muito menor do que o do Rio Grande e sua capacidade é de 200 milhões de metros cubicos. A's 10 horas e 30, foram feitas as seguintes leituras, num local proximo á represa:

TABELLA II

Profund. metros	Temp.	Oxygenio	CO_2	pH	$CaCO_3$
0	23.6	6.4	+ 2	< 6.8	6.8
2	21.1				
4	20.8	6.4	+ 2.5		
6	20.4				
7	19.8				
8	19.4	6.4	+ 4		
11	19.0	6.5	+ 5.5		6.8

Os dados sobre a temperatura mostram que existia certo gráo de aquecimento da agua da camada superior, com consequente estagnação da agua profunda. Mas a curva da temperatura não tem o aspecto typico da estratificação. A pequena differença do oxygenio e do dioxydo de carbono entre a agua superficial e a profunda mostram que a differença de temperatura não existia ha muito tempo. Nos dois primeiros metros havia um decrescimo de 2,5° C, o que muito provavelmente era devido ao aquecimento occorrido no mesmo dia, antes que as observações fossem feitas. Num dia quente, sem vento, o primeiro meio metro da camada superficial da agua pode aquecer-se sensivelmente, como, por exemplo, o evidenciaram leituras feitas em outros pontos deste lago, logo após o meio dia; verificamos ahi 27,4° na superficie e somente 22,4°, a um metro de profundidade. Nessa occasião a superficie mostrava-se perfeitamente calma, mas subitamente soprou um vento forte e a temperatura superficial cahiu em poucos minutos para 26°, devido á mistura com a agua mais fresca das camadas inferiores. E' bem provavel que em poucas horas tal vento conseguisse misturar completamente as aguas, de alto a baixo.

Reservatorio de Sorocaba:

A capacidade deste reservatorio, um pouco maior do que o de Guarapiranga, é de 233 milhões de metros cubicos. As pesquizas foram feitas no dia 24 de Outubro de 1935, junto á barragem, até 22,5 metros de profundidade. Os dados obtidos foram os seguintes:

TABELLA III

Profund. metros	Temp.	Oxygenio	CO_2	pH	$CaCO_3$
0	20.5	6.2	+ 1.5	6.95	9.1
5	20.8	6.2	+ 1.5	6.85	
10	20.8	6.2	+ 1.5	6.85	
11	20.6				
12	18.8				
15	18.5	5.2	+ 2.5	6.70	
21	18.2	4.6	+ 3.0	6.65	10.2

Nesse dia, de manhã, o ceu esteve claro, mas á volta do meio dia começou a chover e a temperatura do ar baixou sensivelmente. O reflexo dessa mudança de condições fez-se sentir nas camadas de agua, de modo que a mais superficial se tornou mais fria do que a de 5 metros de profundidade.

Aliás a curva da temperatura é typicamente a das aguas thermicamente estratificadas. Neste caso a thermo-estratificação apresentava apenas um metro de espessura, com decrescimo de 1,8º entre 11 e 12 metros.

Nos 11 metros superiores a agua accusava uma temperatura quasi uniforme, ao passo que a partir de 12 metros havia um decrescimo gradual.

Os dados chimicos traduzem os effeitos da estratificação thermica. Da superficie até 10 metros as condições chimicas eram essencialmente uniformes, ao passo que a agua mais baixa accusava um theor menor de oxygenio, um theor maior de CO_2 e uma concentração mais accentuada de ions de hydrogenio.

Comtudo as differenças não eram muito sensiveis e podemos presumir que a estratificação thermica se havia estabelecido recentemente.

Aguas proximas de Amparo:

No decorrer de uma semana do mez de Novembro fizemos 18 visitas a 14 aguas situadas nas visinhanças da cidade de Amparo. Taes

aguas eram de typos diversos, desde simples lagoas de poucos centimetros de profundidade até grandes tanques de muitos alqueires de area e varios metros de fundo. Em nenhum caso dispunhamos de barco, de modo que as observações foram levadas a effeito nas margens. Em taes condições, mesmo um estudo prolongado não pode dar senão uma ideia imperfeita dos caracteristicos essenciaes da massa de agua. Por essa razão cuidamos de visitar o maior numero possivel de aguas e em cada uma dellas dispendemos apenas o tempo necessario para a determinação do pH, alcalinidade ao methyl-orange, collecta de plancton, além de annotações geraes. Em alguns casos não fizemos observações chimicas. (Vide tabella n.º IV).

Em relação ao pH, as aguas eram quasi neutras; o pH minimo era de 6,8 e o maximo 7,5. A alcalinidade ao methyl-orange, expressa em $CaCO_3$, variava de 27 a 82 ppm. A maioria das aguas accusava um pH muito mais alto que o dos grandes reservatorios proximos de São Paulo. Com poucas excepções havia abundancia de grandes plantas aquaticas ao longo das margens e em alguns casos a vegetação cobria inteiramente o fundo. E' provavel que a actividade photosynthetica dessas plantas tenha determinado um maior valor do pH, em comparação com o dos grandes reservatorios.

Um caracteristico muito accentuado das aguas de Amparo residia na ausencia quasi completa de crustaceos no plancton das aguas abertas. Isto é, uma rede de plancton lançada de forma a evitar os bordos das plantas, portanto não arrastada por entre ellas, quasi invariavelmente não trazia crustaceos de pequeno tamanho, juntamente com larvas de insectos e *Hydracarina*. A ausencia de formas limnoticas está em profundo contraste com as aguas do Nordeste do Brasil, onde uma rede lançada da margem traz em geral certa variedade de crustaceos em consideravel abundancia. No Nordeste brasileiro quasi todas as aguas, sem levar em conta o volume, têm crustaceos do genero *Diaptomus*, mas perto de Amparo apenas em uma dellas (Poço Gerbi) foram encontrados *Diaptomus*. Na maioria dos casos os Crustaceos colhidos eram pequenos representantes de *Cyclopideos* e *Cladoceros*.

Aguas proximas de Campinas:

Nos dias 10 e 11 de Dezembro visitamos 11 aguas nos arredores de Campinas. Como em Amparo, não dispunhamos de bote e, por isso empregamos pouco tempo em cada ponto de observação, das margens. As temperaturas tomadas, em muitos casos não dão ideia da temperatura da massa principal de agua. Os dados estão expostos na Tabella V. Como em Amparo, as aguas accusavam reacção quasi neutra, variando o pH de 6,4 a 7,6, de modo que todas eram acidas

para a phenolphtaleina como indicador. Existia ampla variação quanto á «dureza» das aguas, indicada pela alcalinidade ao methyl-orange; a quantidade minima era de 14 p. p. m. e a maxima, 59 p. p. m.; porém não pudemos assignalar uma distribuição regional, desse ponto de vista.

Em relação ao numero de crustaceos das aguas abertas, a região de Campinas parecia ser mais bem aquinhoada que a de Amparo, si bem que muitas aguas não possuam plankton e as restantes o tenham em quantidade apenas moderada. Predominavam as formas de *Cyclopideos* e *Cladoceros* de pequeno tamanho. Sómente duas aguas continham crustaceos do genero *Diaptomus*.

Em geral as plantas aquaticas eram menos abundantes do que em Amparo, ainda que em muitos casos a vegetação das margens fosse tão densa que tornava inaccessivel a agua aberta.

Pequenas aguas proximas de São Paulo:

Em principios de Dezembro de 1935, visitamos pequenos conjunctos de agua nas visinhanças de São Paulo. Os dados estão expostos na Tabella VI. O pH, examinado em oito aguas, mostrou que, com excepção de uma, eram todas ligeiramente acidas na escala do pH, e todas acidas á phenolphtaleina.

Como os grandes reservatorios dessa região, taes aguas continham pequena quantidade de carbonatos. Tres dellas não continham crustaceos planktonicos na agua aberta; algumas tinham pequenos crustaceos, em certa abundancia, ao passo que sómente duas foram consideradas ricas em plankton.

Em geral o desenvolvimento das plantas aquaticas era muito menos pronunciado do que nas aguas das regiões de Amparo e Campinas.

Estudos Taxonomicos:

Os animaes aquaticos invertebrados, de S. Paulo, mereceram ainda pouca attenção dos naturalistas e muitos dos grupos são quasi desconhecidos. E' o que tambem se verifica com relação aos crustaceos. As colleções feitas em quasi todas as aguas por nós visitadas foram entregues a especialistas para identificação. Já haviamos tido occasião de examinar colleções de *Diaptomus,* um genero de crustaceos pertencentes á ordem dos *Copepodos* e subordem *Calanoida.* As aguas de S. Paulo são excessivamente pobres quanto ao numero de especies deste grupo e mesmo poucas aguas as possuem.

Apenas quatro especies foram reconhecidas, colhidas sómente em nove aguas, ou seja em menos da quarta parte do total das aguas examinadas. Em breve publicaremos um estudo sobre as quatro especies, com as respectivas descripções.

TABELLA IV — OBSERVAÇÕES EM AGUAS PERTO DE AMPARO

Nome	Tamanho	pH	p. p. m. $CaCO_3$	Plancton	Observações
Tanque Fabrica Cortume	—	7.5	51	Nenhum. Raros *Cyclops* nas margens	Agua leitosa. Poucas plantas.
Tanque Coqueiros	—	7.4	41	Idem.	Agua turva. Poucas plantas.
Poça na Chacara Brasilia	Poucos mts.²	—	65	Larvas de *Corethra*, pequen. crustaceos	Muito turva. Sem plantas
Tanque Junqueiro (Baixo)	—	6.8	27	Nenhum. *Cyclops*, Hydrac., entre a vegetação, larvas de insectos.	Orlado de vegetação. Agua leitosa.
Tanque Junqueiro (Cima)	—	7.1	48	Muitos pequenos *Cyclops*, *Cladocera*.	Fundo coberto de vegetação. Sem agua aberta. Raso.
Tanque Eugenio Billi	—	7.1	82	Nenhum. Um *Cyclops* do lodo.	Turvo. Muito pouca vegetação.
Tanque D. Marianna Pastana	—	7.1	59	Sem plankton.	Capim em uma das margens. Muita *Spyrogyra* fluctuante.
Rio Jaguary	—	7.4	—	—	Agua turva.
Cimentado da fonte do Hospital	Poucos mts.²	—	—	Sem plankton	Muitos peixinhos alimentados artificialmente.
Tanque cimentado do Jardim Publico	—	—	—	Sem plankton	Muito detricto. Lençol de poucos cms.
Tanque Martirio	—	—	—	*Cyclops*, *Hydracarina* entre as plantas.	Densa faixa de vegetação torna inacessivel a agua aberta.
Poço Gerbi	—	—	—	*Diaptomus*, *Cyclops* *Cladoceras* entre as plantas.	Lençol de poucos cms., abundancia de plantas.
Tanque Urias	—	—	—	Nenhum. Poucos *Cyclops* entre as plantas.	Tanque muito velho, orlado c/ plantas.
Tanque Pedreira	—	—	—	Nenhum. *Cycl. H.* larv. de insec. entre as plantas.	Quasi todo tomado pelo capim. Pouca agua aberta.

TABELLA V — OBSERVAÇÕES EM AGUAS PERTO DE CAMPINAS

Tanque	Tamanho	Temp. C.	pH	p. p. m. Ca CO3	Plankton	Observações
Itaguassú	1 alq.	26.2	6.9	—	Nenhum.	Complet. orlado por plantas. Agua escura.
Bom Fim	4 alq.	—	7.7	45	Muitos pequenos *Cyclops.*	Orlado por plantas. Agua turva.
Quilombo (de Baixo)	4 alq.	25.2	7.2	14	Poucos *Cyclops Cladocera.*	Sem plantas. Turva.
Quilombo (de Cima)	pequeno	24.4	6.4	14	Nenhum.	Coberto pela vegetação Agua escura.
Boa União	2 alq.	26.2	7.6	41	Poucos *Cyclops Cladocera.*	Poucas plantas.
Rio das Pedras	13 alq.	26.0	6.9	15	*Diaptomus, Cycl.; Cl.* não abundantes.	Poucas plantas. Agua escura.
Taquaral N.o 2	1/2 alq.	25.0	6.9	17	Poucos *Cycl. Cladocera.*	Sem plantas. Turva.
Taquaral N.o 4	2 alq.	24.2	6.5	20	*Diaptomus. Cycl. Cladocera* poucas.	Sem plantas. Muito turvo.
Laranjeiras	1 alq.	—	—	—	*Cyclops, Cladocera* não abundantes.	Sem plantas. Muito turva.
Baroneza (de Baixo)	1/2 alq.	—	—	—	—	Toda margem tomada pela vegetação. Inaccessivel.
Baroneza (de Cima)	1/2 alq.	26.0	7.0	—	Muitos pequenos *Cladocera.*	Muitas plantas em uma das margens. Turva.
Lapa	1/4 alq.	27.1	7.2	54	Nenhum.	Muitas plantas em um das margens.
Matto Dentro	1/4 alq.	—	—	59	Poucos *Cy. Cladocera.*	Sem plantas. Turva.
St.a Anna (de Baixo)	1/4 alq.	26.4	7.3	41	Poucos *Cy. Cladocera.*	Sem plantas. Turva.
St.a Anna (de Cima)	1/2 alq.	24.6	7.1	43	Muitos pequenos *Cladocera.* 2 esp. *Cyclops.*	Muitas plantas. Turva.

TABELLA VI — PEQUENAS AGUAS PERTO DE SÃO PAULO

Nome	Localidade	pH	$CaCO_3$	Plankton	Observações
Tanque (principal)	Horto Florestal	6.8	14	Sem plankton	Raso. Muita vegetação. Algumas Algas filamentosas.
Tanque (pequeno	»	6.2	18	Muitos pequenos *Cyclops. Cladocera*	Algumas plantas.
Açude	»	—	—	Muitos pequenos *Cyclops. Cladocera*	Algumas plantas.
Lago	Recreio do Lago	7.4	9	Poucas pequenos *Cyclops.*	Poucas plantas. Agua verde talvez devido a algas microscopicas.
Tanque do Moinho	S. Bernardo	6.4	10	Sem plankton	Muitas plantas.
Tanque	Varjinha	6.2	18	*Cladocera; Corethra*	Sem plantas. Agua escura.
Olho d'agua	»	6.0	—	—	—
Rio Cubatão	Cubatão	6.6	8	Poucos *Diaptomus, Cyclops, Cladocera*	Agua turva. Temp. 23.4
Riacho Branco	»	6.6	8	—	Agua clara. Temp. 23.2
Lago das Carpas	Sto. Amaro	—	—	Sem plankton	Poucas plantas.
Poço	Pinheiros	—	—	Abundancia de *Diaptomus, Cyclops, Cladocera*	—
Bacia	Jardim da Luz S. Paulo	—	—	Abundancia de *Diaptomus* e *Cyclops.*	—

ABSTRACT

This paper gives the results of limnological studies upon various types of inland waters at the State of S. Paulo, Brazil. There are given tables with measures of temperature, oxygen, carbon dioxyd, pH and $CaCO^3$ as well as general remarks on the microfauna of these waters.

The taxonomical work about the microfauna will be published later.

———o———

AS PIÁBAS DOS AÇUDES NORDESTINOS
(CHARACIDAE, TETRAGONOPTERINAE)

POR

R. von Ihering e P. de Azevedo

Trabalho em collaboração do Instituto Biologico de S. Paulo com a Commissão Technica de Piscicultura do Nordeste

Com 2 figuras no texto e estampas 9-12

As especies de que aqui nos occupamos — peixinhos conhecidos pelos nomes de «l a m b a r y s» no Brasil meridional, de «p i á b a s» na região comprehendida entre o Rio de Janeiro e o extremo Nordeste, e de «m a t u p i r í s» na Amazonia — são *Characideos* pertencentes á subfamilia dos *Tetragonopterineos*.

Trata-se da mais heterogenea das vinte e tantas subfamilias dos *Characideos*, pois comquanto os caracterize bem a serrilha do bordo dos dentes, o feitio geral do corpo apresenta differenças a ponto de parecer pouco natural a inclusão da «p i r a c a n j u b a» *(Brycon)* e generos alliados, neste mesmo conjuncto. Habitando ambientes diversos, será muito natural que tambem a ecologia dos varios generos, á medida que fôr sendo estudada, venha revelar modalidades discrepantes umas das outras, no que concerne á multiplicação.

Relataremos aqui o que observamos, quer no ambiente natural, quer em laboratorio, a respeito da desova e da evolução de duas especies de «l a m b a r y s» ou, como diremos aqui com mais propriedade, das «p i á b a s» (*) pois que os trabalhos foram executados no Nordeste.

Pertencem ambas ao genero *Astyanax*, que abrange cerca de 70 especies e de cujo total, pelo menos metade habita aguas brasileiras. A' semelhança do que fizemos com relação á c u r i m a t ã *(Prochilodus argenteus)* (7) estudaremos as p i á b a s sob os seguintes pontos de vista:

1 — *Utilidade das piábas;*
2 — *Especies representadas nos açudes de Campina Grande.*
3 — *Distribuição geographica.*
4 — *Alimentação;*
5 — *Sexo, crescimento e peso;*
6 — *Desóva e hypophysação,*
7 — *Evolução de ovo a larva.*

Deixamos consignado aqui nosso agradecimento pelo valioso auxilio que durante estes trabalhos nos prestaram os Srs. Drs. L. Canale,

(*) A denominação vulgar "p i a b a" presta-se a confusão, visto que no Brasil meridional são conhecidos por este nome os grandes peixes do gen. *Leporinus* (subfam. *Anostomatinae*), que no nordeste são conhecidos por "p i á u s".

B. Borges Vieira e M. Vianna Dias, assistentes da Commissão Technica de Piscicultura e A. Scorzelli, ex-assistente da mesma.

Utilidade das piábas

Como tantas outras especies pertencentes á mesma subfamilia (gen. *Hemigrammus, Hyphessobrycon, Moenkhausia, Tetragonopterus* etc.), preferem as piábas as aguas dos pequenos rios e as lagoas e, se estão em rios maiores, permanecem nas margens ou nos baixios. Como sua alimentação consiste parte em vegetaes, parte em pequenos insectos e suas larvas aquaticas, podem ellas viver em cardumes, como de facto são encontradas, reunidas ás vezes ás centenas. O pescador, quando quer apanhal-as em grande quantidade, atira antes uma pedrinha na agua, para momentos depois cobrir o mesmo lugar com a tarrafa; as piábas accorrem, attrahidas pelo baque do objecto lançado, que poderia ser um bom alimento e logo em seguida são todas envolvidas pela rede. Esta deve ser de malha adequada, quando se tem em vista fazer contagens, pois do contrario, fogem as piábas pequenas e as de tamanho médio. Atirada a tarrafa de malha grande, logo ao afundar a chumbada, uma chusma de exemplares miudos vára as malhas e, fugindo espavoridos, saltam fóra d'agua, formando chuveiro.

Mais adiante daremos o resultado de varias contagens; aqui diremos apenas que podem conviver muitas especies de *Tetragonopterineos* nas mesmas aguas e nos mesmos lugares. Assim tivemos occasião de verificar que todas as especies desta subfamilia representadas em certas zonas do Nordeste, cohabitam o mesmo açude; tambem no rio S. Francisco, na embocadura de um affluente, colhemos cerca de 15 especies, sem mudar de lugar e, visto como não dispunhamos na occasião de melhores redes, é bem possivel não termos apanhado todas.

Em toda a nossa ichthyofauna da agua doce cabe-lhes papel bem importante no conjuncto biologico a que hoje se dá a denominação de *biocenose;* só os *Cyprinodontes* (guarú) podem ser encontrados em numero mais avultado que as piábas; mas aquelles peixinhos gozam da vantagem de serem desprezados pelos peixes carnivoros, talvez por terem sabor amargo. Assim, são os *Tetragonopterineos* o pasto mais abundante para todos aquelles peixes que se contentam com prezas pequenas.

Tambem para o homem, em certas circumstancias, elles têm directamente valor mercantil. Sendo facilmente apanhados em grande quantidade, em qualquer banca de peixe se encontram, geralmente arrumados em fieiras, isto é, enfiados num cordel ou cipó, que passa pelas aberturas branchiaes.

Mandamos tarrafear com malha fina em um açude rico em piábas e o resultado poderia ter sido ainda maior, no mesmo lugar, pois que a ultima tarrafada ainda rendera quantidade apreciavel. Em 7 lances colhemos 3.300 grs. de piábas, ou seja cerca de 700 exemplares, sendo $^2/_3$ de *A. bimaculatus* com peso medio de 6 grs. e $^1/_3$ de *A. taeniatus* com peso medio de 4 grs.

E bem saborosas são as piábas, quando fritas na gordura, a ponto de ficarem bem torradas (*), com o que as espinhas podem ser mastigadas sem inconvenientes.

Comtudo não chegam estes peixinhos a constituir, propriamente, um prato equivalente ás outras comidas; figuram antes como petisco, á semelhança de «hors d'oeuvre».

Quando o pescador não pode levar logo o resultado da pescaria para o mercado, prepara «rosarios» de piábas; depois de tel-os rapidamente descamado, por um talho feito transversalmente na altura do esophago, sob pressão adequada, retira os intestinos. Em meia hora fica prompto um «rosario» de 160 peixinhos, de 5 a 6 cms. de comprimento em media e ligeiramente salgados ou simplesmente seccos ao sol; essa mercadoria lhe rende $600 réis; o peso das 160 piábas seccas é de 250 grs.

Papel realmente importante cabe ás piábas no Nordeste quando empregadas no serviço de defesa contra a febre amarella. Em nossa publicação referente aos peixes larvophagos (Bibl. 5), ao enumerar as especies de peixes que são utilizadas pela hygiene, démos o devido destaque aos *Tetragonopterineos* e assignalamos as seguintes especies nordestinas, como sendo as mais adequadas a se manterem nos recipientes em que é guardada a agua para o consumo caseiro: *Hemigrammus unilineatus, Astyanax bimaculatus* e subespecies, *A. taeniatus* e *Hyphessobrycon parvellus*. Pudemos verificar que alguns exemplares de *Ast. bimaculatus* foram mantidos durante mais de um a dois annos em «fôrmas» (vasos de barro, de 100-200 litros de capacidade) nas quaes a agua potavel é coada e quasi sempre mantida de forma a evitar a postura dos mosquitos.

As poucas larvas que ainda assim ahi começam a desenvolver-se, são logo devoradas pelo peixinho esfaimado. Este regimen de jejum prolongado tem aliás a vantagem de excretarem os peixinhos muito poucas fézes.

Especies representadas nos açudes

A «piába creoula» é a mais commum nos açudes de Campina Grande: *Astyanax bimaculatus vittatus* Cast. (Est. 11, fig. A.

(*) Na linguagem nordestina *torrado* é aliás synonimo de *assado*; assim manda-se "torrar uma gallinha".

O colorido geral é branco-prateado, com numerosos pontinhos pretos, que dão um sombreado mais ou menos intenso ao dorso e á parte superior dos flancos, pelo que o prateado geral se torna menos vivo. Caracteriza a especie a mancha oval, escura, longitudinal, sobre a 3.ª até 6.ª escamas atraz do operculo; na base da cauda ha uma grande mancha preta prolongada, mais apagada para a frente; anal com colorido coralino ou rubro. Cresce até 109 mms., pesando neste caso cerca de 42 grs.

A «piába branca», *Astyanax taeniatus* JENYNS (*), semelhante á precedente, porém menor e mais clara, com prateado vivo, por não ter senão poucos pontinhos pretos sobre as escamas. Atraz do operculo ha uma faixa vertical, em V mais larga em cima e afilada em baixo e que muitas vezes é tão pouco sombreada, que se torna difficil percebel-a. As maiores femeas medidas attingiam 76 mms. de comprimento e 9 grs. de peso.

Hyphessobrycon parvellus ELLIS é uma piabinha muito delicada, branca, com mancha redonda na cauda; esta ultima mancha ás vezes é bem delimitada, redonda, ligada a uma linha preta que se extende até o meio do corpo; em outros exemplares ella é diffusa na base da cauda, sem prolongamento sobre o flanco. As dimensões raro ultrapassam 30 mms. de comprimento. O numero de ovulos parece ser reduzido, pois que em exemplares grandes contamos apenas 352 e num exemplar de 20 mms. havia 235 ovulos.

Constatamos ainda a presença de *Hemigrammus unilineatus* (GILL) na região litoreana, especie que attinge só 50 mms. de comprimento e se caracteriza pelo colorido da dorsal, que tem o apice manchado de preto e a anal tem uma faixa preta um pouco obliqua sobre os primeiros raios, o preto contrastando com o branco leitoso que orla esse desenho.

Varias vezes verificamos que a proporcionalidade da frequencia das especies acima mencionadas em Campina Grande é a seguinte:

Ast. bimaculatus	57 %
Ast. taeniatus	38 %
Hyphess. parvellus	5 %

Distribuição geographica

Em uma das sessões da Academia Brasileira de Sciencias (1935) foi amplamente discutido o caracter da fauna nordestina, no que ella apresenta de peculiar em correlação com o ambiente. Não podiamos

(*) Devemos corrigir o seguinte lapso, occorrido em nossa publicação (Bibl. 6.) Referindo-nos a esta especie, no texto seu nome figura sempre como *Ast. lineatus*, quando de facto nos referiamos a *Ast. taeniatus*. Existe uma especie com aquelle nome, mas seu habitat é o Paraguay.

ainda, nessa occasião documentar rigorosamente o que avançavamos, por ainda não estar devidamente classificado o material colligido pela Commissão Technica de Piscicultura; apenas eram impressões que acerca de *Peixes,* externavam, além de um dos presentes autores o Prof. E. H. Cordero (Montevideo), que trabalhára comnosco no Nordeste e dedicára especial attenção aos *Hirudineos, Espongiarios* e *Bryozoarios;* Mello Leitão, que havia estudado o material de *Araneidas* e *Escorpionidas,* colligido pela C. T. P. de Pernambuco ao Rio Grande do Norte; L. Travassos e C. Pinto, aos quaes foram confiados varios grupos de *Insectos* daquella mesma região.

Baseados em tão variado material, chegamos todos á mesma conclusão: predominam no Nordeste as especies de mais vasta distribuição pela Região Neotropica; não ha tendencia para a formação de generos especializados e são relativamente bem poucas as especies que têm caracter especial; em summa, a fauna regional quasi não tem generos proprios, é pobre em especies typicas e a maioria é encontradiça tambem em grande parte da região neotropica.

As piábas de que aqui tratamos exemplificam bem essa affirmação. *Ast. bimaculatus* encontra-se desde o rio Magdalena até o Prata e a subespecie baseada em caracteres assaz subtis, *A. b. vittatus* Cast. é conhecida da Bahia ao Rio Grande do Norte; *Ast. taeniatus* extende-se do rio Parahyba do Sul até o Rio Grande do Norte e Ceará. São estas duas as especies que, juntamente com a «trahira», *Hoplias malabaricus),* os «acarás» (2 especies de *Cichlideos),* o guarú *(Cyprinodontideo)* e o pequeno *Characidium fasciatum* se encontram em todas as aguas ao redor de Campina Grande (Estado da Parahyba), bem como o «curimatã» *(Prochilodus argenteus),* quando se trata de açudes regulares ou grandes. Todas essas especies ultrapassam amplamente os limites da região nordestina propriamente dita, sujeita ás seccas periodicas. Impõe-se a impressão de que são esses os ultimos remanescentes de uma fauna outrora bem mais numerosa e variada; por terem capacidade de resistencia e de adaptação sufficientes para poder extender seu habitat sobre area tão ampla e de condições tão variadas, como as que distinguem a Amazonia do Prata, puderam tambem resistir ás vicissitudes a que ficaram sujeitas após a modificação do clima nordestino, outrora por certo bem mais favoravel á prosperidade da flora e da fauna.

Poder-se-ia tambem inverter a questão, attribuindo ás especies supramencionadas, em virtude da sua adaptabilidade, a capacidade de só ellas terem penetrado na região desde sempre flagellada pelas seccas; as especies mais debeis, menos ubiquitarias, teriam talvez ten-

tado, mas nunca conseguido, penetrar e fixar-se no nordeste, arido desde sua origem.

E' difficil documentar este ou aquelle modo de ver. Não foram feitos ainda os trabalhos de analyse que devem preceder os da synthese. Nada sabemos ainda de paleopotamographia, estudo para o qual o geographo encontra farta documentação; faltam-nos as interpretações a serem dadas a documentos geologicos, como os das pedras lavradas e accumuladas de forma a permittirem conclusões seguras sobre o modo e a epoca da sua origem. A botanica encontra recursos e argumentos que, ligados á analyse de terras ou a outros factores geophysicos ou biologicos, deverão falar claro a quem se dér o trabalho de colligir e interpretar essa documentação.

Por nossa parte, proseguindo nos trabalhos que motivaram a creação da Com. Tech. de Piscicultura do Nordeste, esforçamo-nos tambem por colligir quantos dados pudermos obter para elucidar as questões zoogeographicas e, uma vez estabelecidas as areas de distribuição, feita portanto a analyse, poderemos abalançar-nos á synthese, cujos resultados deverão coincidir com os dos outros estudos geophysicos e biologicos da região.

Alimentação

Como já dissemos acima, as piábas procuram tanto o alimento vegetal como o animal. No captiveiro, mantidos em aquarios ou outros recipientes pequenos, é natural que comam de tudo quanto possam digerir. Mas as numerosas autopsias que fizemos de material recem-pescado, demonstraram que esses peixinhos não têm propriamente predilecção por determinado alimento; entre os vegetaes predominam ás vezes as algas filiformes, com as quaes, podem encher completamente o estomago, mas tambem pegam, não raro, fragmentos de folhas de dicotiledoneos e sementes. Tambem do reino animal as piábas abocanham quasi tudo quanto possam deglutir: vermes, insectos e suas larvas e mesmo peixinhos na phase de alevinos. Certa vez, em um açude, vimos que um grupinho de piábas saltava da agua para beliscar as hastes de um vegetal; examinando este de perto, encontramos ahi fixadas numerosas colonias de *Espongiarios,* que, após ter baixado o nivel do açude, haviam ficado em secco a 10 cms. acima da agua. O respectivo material foi entregue para classificação ao nosso prezado collega Prof. E. H. Cordero, de Montevideo, o qual durante algum tempo acompanhou os trabalhos da C. T. P. e que se encarregou do estudo dos Espongiarios e outros grupos de sua especialização.

Sexo, crescimento e peso

Como é sabido, em varios generos de *Characideos,* na epoca da procreação, forma-se um caracter sexual secundario, que permitte distinguir os machos, os quaes, durante os mezes restantes do anno, apenas differem ligeiramente das femeas por serem um pouco mais esguios e, proporcionalmente, menores. Mezes antes da desova, a anal do macho dos *Tetragonopterineos* e tambem dos *Salminus,* («d o u r a d o s» e «t a b a r a n a s») se reveste de minusculos espinhos nos raios anteriores, principalmente na parte apical destes. Basta correr os dedos, de cima para baixo, para notar a aspereza, que differencia os machos. Muito raras vezes se encontram tambem taes espinhos na nadadeira anal da femea, cujo ovario, porém, macroscopicamente nos pareceu normal. Passado o tempo da desova, esse caracter sexual desapparece.

Para a maioria dos peixes, a relação «comprimento - altura» é assaz constante e por isso é mencionada nas descripções das especies. Mas entre os *Tetragonopterineos* ha especies em que tal caracter, bem como o numero de escamas da «linha lateral», é muito variavel, o que aliás EIGENMANN, em sua Monographia deste grupo pôz em relevo, mediante um quadro estatistico. Nossas verificações nesse sentido, feitas com material fresco, permittem-nos completar aquelles dados com

TABELLA I

Astyanax bimaculatus — Campina Grande, Parahyba
Altura e Peso em relação ao Comprimento

Comprimento	Macho		Femea	
	Altura	Peso	Altura	Peso
55 mm.	17 mm.	4,5 gr.	—	—
57 mm.	21 mm.	6,0 gr.	—	—
64 mm.	18 mm.	7,0 gr.	—	—
66 mm.	18 mm.	5,5 gr.	—	—
68 mm.	22 mm.	6,5 gr.	21 mm.	7,2 gr.
68 mm.	—	—	25 mm.	13,0 gr.
70 mm.	20 mm.	7,5 gr.	21 mm.	6,5 gr.
70 mm.	26 mm.	7,0 gr.	21 mm.	7,5 gr.
70 mm.	27 mm.	8,5 gr.	—	—
74 mm.	—	—	22 mm.	8,0 gr.
74 mm.	—	—	28 mm.	12,0 gr.
89 mm.	—	—	35 mm.	22,5 gr.
90 mm.	—	—	39 mm.	21,3 gr.
91 mm.	—	—	35 mm.	23,0 gr.
95 mm.	—	—	39 mm.	29,0 gr.
97 mm.	—	—	38 mm.	30,5 gr. *
108 mm.	—	—	47 mm.	41,0 gr. **
109 mm.	—	—	43 mm.	35,4 gr.

Nota: — *) Peso dos ovarios apenas 1,5 gr. poderia ser 5-6 gr.)
**) Peso dos ovarios 7,215 gr.

TABELLA II

Astyanax taeniatus — Peso em relação ao Comprimento

Comprimento	Peso do macho	Peso da femea
	Grs.	Grs.
38 mm.	1.3	—
40 »	—	1,7
42 »	—	1,9
44 »	2,0	2,1
46 »	—	2,8
48 »	2,7	—
50 »	2,6 a 2,9	3,0
52 »	—	3,0 a 4,0
54 »	3,0 a 3,4	3,0 a 4,5
56 »	3,9	3,0
58 »	4,5	6,0
60 »	3,5 a 3,7	5,0 a 6,6
62 »	—	5,2 a 7,2
64 »	—	7,7
66 »	—	6,0 a 8,2
68 »	—	6,2
70 »	6,2	7,0
72 »	—	—
74 »	7,5	7,8
76 »	—	9,0

a pesagem e a verificação do volume dos ovarios. Claro está que só as femeas que ainda não tenham iniciado a desova parcellada apresentam o maximo de altura do corpo e peso.

Com o resultado de numerosas pescarias, feitas com malha miuda, procuramos estabelecer proporcionalidade quanto á representação dos sexos. Damos a seguir algumas das cifras obtidas em cada uma das pescarias, todas dos arredores de Campina Grande:

TABELLA III

Proporcionalidade dos sexos (*)

Ast. bimaculatus	Machos —	92	27	45	21	8	3	8
	Femeas —	127	14	56	24	118	52	8
Ast. taeniatus . .	Machos —	12	25	7	3	31	—	—
	Femeas —	15	196	46	4	37	—	—

(*) Cada conjuncto de ♂♂ e ♀♀ correspondente a uma pescaria.

Pode ser que um pequeno numero de machos, por serem muito esguios, em alguma das pescas, tenha escapado pelas malhas, mas tivemos a prova de que poucas vezes tal se deu. Ainda assim predo-

minam os casos em que o numero de machos equivale mais ou menos ao das femeas; só uma vez entre 12 foi maior o numero de machos que o das femeas.

Aliás as condições de pesca variam muito no mesmo lugar, conforme a hora. Assim ás 10 horas da manhã colhemos só 850 grs. ou sejam cerca de 170 exemplares no mesmo lugar em que ás 15 horas do mesmo dia obtivemos 3.300 grs. ou sejam 700 exemplares, com egual numero de redadas.

Da tabella seguinte é difficil tirar conclusões, por não estar terminada ainda a analyse das escamas, para a delimitação dos grupos da mesma edade.

TABELLA IV

Astyanax bimaculatus — Arredores de Campina Grande, Parahyba

Proporcionalidade numerica em relação ao tamanho

Comprimento	Macho	Femea	Macho	Femea	Macho	Femea	Macho	Femea	Total	
									Macho	Femea
44 mm.	2	—	—	—	—	—	3	1	5	1
46 »	1	—	—	—	1	—	4	3	6	3
48 »	4	1	2	—	3	—	6	8	15	9
50 »	3	1	4	—	3	—	—	—	10	1
52 »	13	2	4	1	5	—	12	12	34	15
54 »	7	9	3	1	3	—	15	10	28	20
56 »	4	7	7	4	6	—	18	—	35	11
58 »	2	10	2	5	3	3	8	7	15	25
60 »	8	3	—	3	2	—	10	11	20	17
62 »	—	7	1	4	—	3	—	22	1	36
64 »	—	7	—	2	1	1	3	—	4	10
66 »	—	4	—	1	1	1	—	—	1	6
68 »	—	1	—	2	—	—	1	—	1	3
70 »	—	1	—	—	—	—	—	21	—	22
72 »	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
74 »	—	—	—	—	—	—	—	21	—	21
76 »	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
78 »	—	1	—	—	—	—	—	2	—	3
80 »	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
82 »	—	—	—	—	—	—	—	6	—	6
84 »	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
86 »	—	—	—	1	—	—	—	2	—	3
90 »	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1
92 »	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
94 »	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
96 »	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
98 »	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1
							Total geral . . .		175	214

TABELLA V

Astyanax taeniatus — Arredores de Campina Grande, Parahyba
Proporcionalidade numerica em relação ao tamanho

Comprimento	Macho	Femea	Macho	Femea	Macho	Femea	Total	
							Macho	Femea
38 mm.	1	—	—	—	—	—	1	—
40 »	—	4	—	—	—	—	—	4
42 »	—	22	—	—	—	—	—	22
44 »	—	14	—	—	—	1	—	15
46 »	6	25	—	—	—	1	6	26
48 »	—	—	2	—	—	1	2	1
50 »	—	38	2	—	—	1	2	39
52 »	3	37	—	1	1	3	4	41
54 »	—	36	4	1	1	—	5	37
56 »	—	5	1	—	—	—	1	5
58 »	4	—	2	4	2	—	8	4
60 »	—	1	1	1	3	—	4	2
62 »	—	2	—	2	3	—	3	4
64 »	—	—	—	1	4	—	4	1
66 »	—	1	—	—	1	—	1	1
68 »	—	2	—	—	—	—	—	2
70 »	4	1	—	—	—	—	4	1
72 »	—	—	—	—	—	—	—	—
74 »	1	5	—	—	—	—	1	5
76 »	—	2	—	—	—	—	—	2
					Total geral . . .		47	212

Desóva e Hypophysação

a) *Movimentação das piábas antes da desóva* — Comquanto esteja dentro da regra geral dos nossos peixes de agua doce que necessitam de «aguas novas» para desovar, a piába nem sempre faz as migrações que descrevemos para a curimatã (Bibl. 7).

Em muitos açudes, nos quaes não se formam grandes riachos durante as enxurradas, a procreação dessa especie se dá, normalmente, logo após as primeiras chuvas. Em outros, porém, que são servidos por volumosos riachos, pudemos observar que as piábas, como a curimatã, os sobem, chegando mesmo a saltar as pequenas quedas d'agua, como fazem os peixes maiores.

Muitas vezes as piábas alcançam as cabeceiras dos riachos horas ou dias antes das curimatãs; tambem nos pequenos filetes d'agua, acima dos riachos maiores, temos observado a subida das piábas.

b) *Desóva natural* — A subida que as piábas fazem nos riachos não significa que ellas desovem em aguas correntosas. Jamais vimos uma piába desovar a não ser em aguas mais ou menos paradas.

Geralmente escolhem as margens dos açudes ou as embocaduras dos rios e riachos ou as curvas destes, isto é, aguas mansas que não tenham mais de um palmo de profundidade e onde haja vegetação submersa.

Ahi «vadeiam», dando pequeninos saltos ou vêm á superficie da agua, fazendo uma especie de volta rapida sobre ella e indo depois para o fundo.

Mais adiante relataremos as observações referentes aos exemplares hypophysados, mantidos em aquario. Em plena natureza varias vezes pudemos assistir a scenas que indubitavelmente deveriam corresponder ao mencionado «vadeiar», seguido do «carroussel», que descreveremos no capitulo referente aos peixes injectados.

Tanto no açude Bodocongó (Campina Grande, Parahyba) como no tanque do Cortume Dias, em Santo Amaro (S. Paulo), no tempo da desóva e sempre no momento em que cahiam as primeiras gottas de chuva, precursoras de maiores aguaceiros, viamos grupos de piábas turbilhonar rente com o espelho d'agua, de modo a encresparem a superficie; certamente estavam desovando. Observações subsequentes que confirmem aquellas e durante as quaes possam ser apanhados alguns exemplares ou pelo menos os ovos recemfecundados, deverão elucidar melhor o caso, aliás interessante porque permitte formular a seguinte hypothese. Os ovarios deverão conter ovulos maduros para o fluxo natural e facil; este amadurecimento, como adiante veremos, quando provocado pela injecção de hypophyses, requer cerca de 5 horas. Será possivel attribuir o amadurecimento natural a algum factor que acompanha a formação da trovoada? Estará em jogo a ionização? Estamos certos, porém, de que não mediou praso superior a 10 minutos entre a queda das primeiras gottas de chuva e a desóva das piábas. Tão breve lapso de tempo poderá ser considerado sufficiente para que se tivesse realizado o amadurecimento dos ovulos?

Em regra, os ovos se prendem ás plantas submersas e só os encontramos no fundo dos açudes quando a camada pegajosa, que reveste a capsula, já se encontra toda envolvida por detrictos que impedem essa ligação ás folhas.

Por essa razão, taes ovos não se prestam a um exame microscopico minucioso, pois nelles só se reconhece, indistinctamente, a estructura geral.

No momento em que está desovando, perde a piába aquella vivacidade que lhe é natural, sendo portanto mais facilmente apanhada. Os primeiros ovos que encontramos nas nossas pesquizas, depois das primeiras chuvas, foram os das piábas; são ellas, bem como as trahiras e talvez os acarás, os primeiros peixes que desovam.

Devemos mencionar, todavia, que durante quasi toda a estação chuvosa não só encontramos ovos como tambem piábas com certa quantidade de ovulos nos ovarios. Este facto, por si só, demonstra que as piábas desovam parcelladamente, isto é, de cada vez sómente lançam certa quantidade de ovulos maduros.

Da mesma maneira, os machos permanecem com os testiculos augmentados durante muito tempo; entretanto, nos espaços que medeiam entre uma chuva e outra, os espermatozoides, em regra, não entram em movimentação quando postos em contacto com a agua. A agua nova se comporta para elles como verdadeiro excitante, do mesmo modo que as injecções de hyphyse, como veremos mais adeante.

E' difficil dizer qual o numero de ovulos de que dispõem as piábas, não só porque esse total varia de accordo com a edade, com comprimento e o peso do peixe, mas ainda porque os exemplares em questão já podiam ter soltado uma parte dos ovulos, durante chuvas precoces.

Foram feitas as seguintes contagens:

TABELLA VI

Astyanax bimaculatus — Peso das ovas e numero de ovulos

N.º de registro	Comprimento	Peso total	Peso das ovas	Total de ovulos	N.º de ovulos por gr.
5.250	70 mm.	± 10,0 gr.	1.287 gr.	7.336	5.700
5.251	75 »	± 12,0 »	1.309 »	6.676	5.100
5.253	108 »	41,0 »	7.215 »	39.855	5.524
5.254	109 »	35,4 »	3.000 »	—	—
9.095	76 »	14,5 »	5.430 »	13.282	2.446
9.112	70 »	— »	1.945 »	16.037	8.245
*9.113 (*)	*73 »	— »	4.050 »	16.810	4.150*

Astyanax taeniatus

Comprimento	Peso total	Peso das ovas	Total de ovulos	N.º de ovulos por gr.
58 mm.	± 6 gr.	2.070	9.232	4.460

(*) Exemplar hypophysado e com parte dos ovulos amadurecidos (veja-se a descripção á pag. 90.)

c) *Hypophysação e desóva forçada* — Continuando os nossos estudos, iniciados com a curimatã e pelos quaes pretendemos libertar a piscicultura nacional dos factores exogenos que determinam a desova, sujeitamos tambem as piábas ás experiencias de hypophysação.

Graças á gentileza do nosso collega Dr. D. Cardoso, do Instituto Biologico de S. Paulo, que nestes estudos muito nos vem auxiliando e que nos enviou 500 hypophyses seccas, pudemos constatar os optimos resultados que com ellas se obtêm, praticamente equivalentes á hypophyses frescas, sempre que se utilize o pó bem triturado e em suspensão bem homogeneisada. Comtudo parece que 6 mezes após á deseccação das hypophyses, o preparado já não age com a mesma efficiencia.

Technica da injecção de hypophyse — Na piába, o local mais indicado para se introduzir a suspensão de hypophyse é a musculatura do dorso. Assim, com uma agulha fina, por baixo das escamas, perfura-se a pelle ao nivel da nadadeira dorsal e, penetrando sempre mais ou menos superficialmente, a ponta da agulha deve alcançar as proximidades da cabeça do peixe. Injecta-se então o conteúdo da seringa, o qual não deve passar de 0,1 cc., pois quanto maior fôr a quantidade do liquido injectado, tanto maior a sua possibilidade de refluxo.

Em regra, a piába supporta bem tal injecção e sómente em um ou outro caso verificamos uma especie de choque, que faz com que o animal permaneça immovel junto á superficie da agua, movimentando apenas as branchias; 20 a 30 segundos depois, esses peixes voltavam a nadar normalmente. Claro está que é preciso evitar lesões da espinha ou a perfuração da vesicula natatoria, accidentes que em géral matam o peixe em poucos minutos.

Reacções observadas nos peixes injectados — Durante as quatro primeiras horas após a injecção, os peixes nada de interessante apresentam, a não ser uma ligeira dyspnéa, que se vae accentuando á medida que os minutos passam.

Essa acceleração dos movimentos branchiaes deve ser combatida com a introducção de agua corrente ou ar, no aquario, pois o mal-estar pode tornar-se tão grande a ponto de influir na vitalidade do peixe, impedindo assim a sua desova. Essa reacção é muito mais evidente nas femeas do que nos machos.

Num ambiente optimo, essa phase de ligeira dyspnéa é seguida de uma agitação, maior nos machos do que nas femeas, mais ou menos 5 a 6 horas depois da injecção.

Os machos procuram então as femeas, dando-lhes cabeçadas ou tentando mesmo mordel-as; estas, porém, em geral, fogem delles, mas em outros casos são levadas a procural-os tambem. Essa agitação vae augmentando, até provocar o que convencionamos chamar de «carrousel» e que consiste no seguinte: os machos collam-se ás femeas, lado

a lado, as mais das vezes um macho e uma femea e, nadando rapidamente, vão descrevendo circulos concentricos em numero variavel de quatro a seis.

Quando a excitação da femea chega ao auge, a espiral descripta alcança a superficie. Nesse momento preciso, a femea lança um jacto de ovulos e o macho, que se encontra justaposto a ella, lança um jacto de esperma.

Devido aos rapidos movimentos do casal, ao executar o «carroussel», a agua em derredor é fortemente agitada e desse modo os ovos são separados uns dos outros, descendo depois lentamente, por gravidade.

Tem-se a impressão de uma chuva de pequeninas perolas transparentes. Cada jacto pode conter de 100 a 500 ovulos mais ou menos.

Isso feito, a femea volta ao fundo do aquario, como se desejasse descançar uns momentos, mas os machos perseguem-na insistentemente e com movimentos rapidissimos de um lado para outro procuram esta ou aquella femea, afim de forçal-a ao «carroussel».

No «carroussel» as nadadeiras anaes desses peixes parecem desempenhar papel importante, pois ambas como que se collam e para tal fim talvez tenham applicação os espinhos existentes na do macho (caracter sexual secundario ao qual já alludimos acima).

Como já dissemos, nem sempre todos os exemplares injectados desovam; um ou outro que não se sentiu apto para taes funcções ou mesmo os que já desovaram, permanecem quietos, não soffrem de dyspnéa e, passado algum tempo, procuram os ovos fecundados que permanecem no fundo do aquario e os devoram.

Para evitar tal facto, costumamos collocar no fundo do aquario uma tela de malhas que permitta a passagem dos ovos e, sob esta, outras de malhas menores, destinadas a reter os ovos, que ahi evoluem normalmente. A's vezes tambem retiramos do aquario os individuos que não estejam tomando parte na desova e logo que esta esteja finda, todos os demais, para que fique garantida a evolução dos ovos.

Modificações que a hypophysação produz nos orgãos sexuaes dos peixes — Na curimatã, tres mezes antes da desova, os espermatozoides já entram em movimentação, quando postos em contacto com a agua e com essa vitalidade permanecem até a procreação; como vimos a desova nesta especie é total.

Nas piábas os factos não se passam da mesma maneira; talvez por desovarem parcelladamente, seus espermatozoides, mesmo em contacto com solução salina, não se movimentam durante os intervallos entre uma e outra desova parcellada.

Essas desovas parciaes são, em regra, determinadas pelas chuvas successivas. A primeira desova das piábas da serie em estudo verificou-se em Campina Grande (Parahyba) após a chuvada de 8-2-35. A segunda enchente deu-se a 15-2-35.

Nesse intervallo examinamos muitos machos que apresentavam espermatozoides immoveis. As femeas estavam bem ovadas. Na manhã seguinte, dia 16, colhemos grande quantidade de exemplares de *Ast. taeniatus* e de *Ast. bimaculatus*. As femeas dos primeiros estavam bem ovadas e os machos com esperma movel, tanto assim que julgamos opportuno tentar a fecundação artificial, porém sem resultado. As femeas de *Ast. bimaculatus* estavam, em geral, com os ovarios vasios, de aspecto gelatinoso e apenas em um caso havia centenas de ovulos grandes, adherentes ao tecido sanguinolento. Os machos estavam com espermatozoides algum tanto moveis.

Systematicamente examinámos o esperma dos machos testemunhas, quer de *Ast. taeniatus*, quer de *Ast. bimaculatus*, antes da applicação da hypophyse. Vejamos, a esse respeito, alguns dados retirados do nosso protocollo:

SERIE G

Ast. taeniatus. Origem: Açude Bodocongó. Dia 19-3-35.

Testiculo direito . { parte caudal: — movimento = 0
parte cephalica: — idem

Testiculo esquerdo { parte caudal: — idem
parte cephalica: — idem

Foi feita a primeira injecção de hypophyse ás 16 horas de 19-3-35.

A segunda foi feita ás 10 horas de 20-3-35. A's 11 horas desse dia examinámos o esperma dos machos injectados.

Eis o resultado:

Testiculo direito . { parte caudal: mov. intensos até 25″; mov. menores até 60″ (ou seja: 0 — 25″ — 60″). (*)
parte cephalica: 0 — 35″ — 70″

Testiculo esquerdo: as mesmas experiencias com egual resultado.

SERIE S

Ast. taeniatus; origem: Açude Prata. Dia 10-4-35.

Machos A e B: { Os mesmos exames nos dois testiculos, tanto na parte caudal como na parte cephalica. Resultado para todas estas observações: *Movimento = 0.*

(*) Por ser muito pratica a annotação introduzida por Scheuring (Bibl. 9) para a contagem do tempo de movimentação dos espermatozoides dos peixes, tambem a adoptamos.

Zero significa o momento em que foi addicionada a agua; o 2.º *algarismo* indica a cessação dos movimentos mais amplos; dahi por diante os corpusculos apenas vibram, permanecendo quasi no mesmo lugar; o 3.º *algarismo* indica o tempo total, desde o inicio da movimentação até a morte do espermatozoide.

Foram os seguintes os resultados obtidos com 2 machos desse mesmo lote, 24 horas depois da injecção:

Macho C	Testiculo direito	parte caudal	0 — 45″ — 70″
		parte cephalica	
	Testiculo esquerdo	parte caudal	0 — 50″ — 70″
		parte cephalica	
Macho D	Testiculo direito	parte caudal	0 — 55″ — 75″
		parte cephalica	
	Testiculo esquerdo	parte caudal	0 — 55″ — 85″
		parte cephalica	

Resultados muito interessantes foram tambem os observados nas femeas, antes e depois das injecções de hypophyses. Como veremos mais adeante, em regra sempre obtivemos desovas 6 a 7 horas depois da hypophysação. Uma ou outra femea não chegou a desovar; talvez para taes excepções tenha concorrido o estado geral dellas, quando não tivesse havido refluxo da suspensão empregada.

Devemos, comtudo, frizar, que as femeas normalmente injectadas, algumas horas após, sempre evidenciavam ventre muito augmentado, entrando em phase de agitação e, quando sacrificadas, nesse momento, sempre demonstravam profundas alterações que se haviam operado nos ovarios.

Vejamos um caso normal, de accordo com nosso protocollo:

Astyanax bimaculatus

Origem: Açude Prata, Campina Grande, 11-4-935

	Femea n.º 9.112 (não injectada)	Femea n.º 9.113 (injectada)
Peso de peixe	9,650 gr.	12,330 gr.
Comprimento	70 mm.	73 mm.
Altura	24 mm.	30 mm.
Peso dos ovarios	1,945 gr.	4,050 gr.
Cubagem	1.500 cc.	4,750 cc.
N.º de ovulos por gr.	8.245	4.150
N.º total de ovulos	16.037	16.810
Ovarios	pouco augmentados, colorido geral uniformemente claro, apenas com os intersticios de limitação dos ovulos esverdeados; ovulos pequenos e opacos.	muito augmentados, colorido verde com pequeninhos pontos esbranquiçados; ovulos maiores, verdes, gelatinosos a ponto de deixarem ver por transparencia os poucos opacos, isto é, impropios para a fecundação. Fina vascularisação em ambos ovarios.

Certamente o exemplar n.º 9.112 já havia descarregado parte dos ovulos, mas confrontando os resultados das contagens da quantidade de ovulos por gramma, verifica-se que, em consequencia da injecção, o peso dos ovarios augmentou de 1:2 e que o volume augmentou na proporção de 1:3.

d) *Desova e evolução dos ovos* — Vejamos agora qual o resultado obtido com a injecção das suspensões de hypophyses, quer frescas, quer seccas. Fizemos nada menos de 20 series de experiencias com as piábas e curimatãs. Citaremos apenas algumas dellas, pois seria demasiado longa e superflua a enumeração de todas.

SERIE H

Ast. bimaculatus. 1.ª desova.

Origem: Açude Bodocongó. Dia 21-3-35.

10 femeas e 10 machos injectados com $^1/_2$ HS. (*).

15,00 horas — Hypophysação;
20,00 » — agitação dos machos e das femeas;
21,00 » — «carroussel»;
21,15 » — desova;
21,40 » — duas cellulas;
21,55 » — quatro cellulas;
22,15 » — oito cellulas;
22,30 » — dezeseis cellulas;
22,45 » — trinta e duas cellulas;
23,30 » — blastoderma em adiantado estado de segmentação (continuação: dia 22-3-35);
1,00 hora — o blastoderma avança; annel germinativo differenciado.

Dessa hora em diante até ás 8,30 proseguiu o desenvolvimento até o esboço do embryão, como se verá nas outras notas;

12,00 horas — a cauda começa a se afastar do sacco vitellino;
14,00 » — movimentos do embryão bem assignalados;
17,00 » — nascem as primeiras larvas.

Total: 20 horas, da fecundação á eclosão.

SERIE H

Astyanax bimaculatus; 2.ª desova.

Do lote da serie H sacrificamos 3 machos e 3 femeas e os restantes foram injectados com $^1/_2$ HS.

11,30 horas — injecção;
17,40 » — desova;

(*) HS. = Hypophyse secca, isto é, preparada pelo methodo de acetona pelo Dr. Dorival Cardozo; HF. = Hypophyse fresca. Doadores: *Hoplias* (traíra) e *Prochilodus* (curimatã).

18,00 horas — blastodisco;
18,15 » — phase de transição para 4 cellulas;
18,26 » — 4 cellulas;
18,34 » — phase de transição para 8 cellulas;
18,40 » — 8 cellulas;
18,46 » — phase de transição para 16 cellulas;
18,50 » — 16 cellulas;
18,55 » — phase de transição para 32 cellulas;
19,00 » — 32 cellulas;
19,04 » — phase de transição além de 32 cellulas;
19,30 » — a divisão continua e o blastoderma forma calota regular;
20,30 » — o blastoderma avança até o equador;
21,00 » — o annel germinativo ultrapassa o equador;
22,30 » — o annel germinativo avança ainda mais;
23,00 » — o embryão differencia-se;
(continuação: dia 23-3-35);
00,20 » — blastoporo quasi fechado;
7,00 » — embryão com 15 somitos; já se movimenta;
15,25 » — embryão augmenta os movimentos, ainda dentro da capsula;
12,30 » — nascem as primeiras larvas;
14,00 » — quasi todas ecluiram.

SERIE I

Ast. taeniatus. Origem: Açude Bodocondó: Dia 23-3-35.
5 machos e 5 femeas $^1/_2$ HS.

9,15 horas — injecção;
14,00 » — agitação;
15,00 » — carroussel;
15,20 » — desova;
15,40 » — esboça-se o blastodisco;
15,50 » — blastodisco;
16,00 » — 2 cellulas;
16,10 » — 4 cellulas;
16,20 » — transição para 8 cellulas;
16,25 » — 8 cellulas;
16,34 » — transição para 16 cellulas;
16,40 » — 16 cellulas;
16,50 » — 32 cellulas
17,00 » — 64 cellulas;

17,12 horas — blastoderma em phase mais adiantada; periblasto differenciado;
18,00 » — o annel germinativo está aquem do equador;
19,00 » — annel germinativo no equador;
20,00 » — annel germinativo ultrapassa o equador;
21,30 » — blastoporo pequeno;
22,00 » — blastoporo quasi fechado;
22,20 » — surge uma elevação em um dos polos;
23,00 » — surge outra elevação proxima á primeira;
(Continuação: dia 24-3-35).
0,50 horas — as elevações vão se transformando em esboço de cabeça e cauda e começam a se distanciar, deixando um maior espaço entre si;
1,00 » — esboço do embryão;
2,30 » — embryão (esboço de olhos, vesicula auditiva e 9 somitos);
5,15 » — embryão com 18 somitos, boa parte da cauda está livre do sacco vitelino e delle um tanto afastada;
5,40 » — o embryão movimenta-se;
9,15 » — nascem as primeiras larvas..
(Total: 18 horas, da fecundação á eclosão).

SERIE J (Experiencias cruzadas)

Ast. bimaculatus. Origem: Açude Prata. Dia 25-3-35.

Ast. taeniatus. Origem: Açude Bodocondó. Dia 25-3-35.

Lote a) 5 femeas e 5 machos *Ast. bimaculatus*. 1/2 HS. cada. Hora de injecção: 2,30.

Desova ás 8,30 até 12,00 de 25-3-35. Evolução normal dos ovos. A's 3 horas de 26-3-35 nasceram as primeiras larvas.

Lote b) 2 femeas *Ast. bimaculatus* e 2 machos *Ast. taeniatus*, 1/2 HS. cada. Hora de injecção: 2,45.

Quer as femeas, quer os machos, excitaram-se, porém nem aquellas procuraram estes, nem estes áquellas. Não houve desova.

Lote c) 1 femea *Ast. bimaculatus* 1/2 HS. e 1 macho *Ast. bimaculatus* não injectado. Hora de injecção: 2,50.

A femea procurava o macho, mas este fugia. Não houve desova.

Lote d) 1 femea *Ast. bimaculatus* não injectada e 2 machos *Ast. bimaculatus* 1/2 HS. cada. Hora de injecção: 2,55.

Ao contrario de c, os machos procuravam a femea, mas esta os evitava. Não houve desova.

SERIE L

Ast. bimaculatus. Origem: Açude Prata. Dia 29-3-35.

5 femeas e 5 machos, 1/2 HF. cada.

9,30 horas — injecção;
14,30 » — agitação;
15,30 » — carroussel;
16,00 » — desova;
18,00 » — final da desova.

Evolução normal dos ovos. As primeiras larvas nasceram ás 9 horas do dia 30-3-35.

SERIE N

Ast. bimaculatus. Origem: Açude Prata. Dia 29-3-35.

2 femeas e 2 machos, 1/2 HF cada.

9,30 horas — injecção;
14,30 » — agitação;
15,30 » — carroussel.

Antes de iniciarem a desova, colhemos, por pressão do ventre, os ovulos sobre os quaes lançamos agua e, logo depois, o esperma (processo humido).

Fecundação dita artificial: 17,40. Evolução normal dos ovos. A's 9,40 do dia 30-3-35 nasceram as primeiras larvas. (Total: 16 horas da fecundação á eclosão).

* * *

Os exemplos citados demonstram claramente a acção da hypophyse sobre os orgãos genitaes dos peixes, quer movimentando e dando a necessaria vitalidade aos espermatozoides, quer accelerando a maturação dos ovulos, obrigando assim as femeas injectadas a desovar, emquanto que, em plena natureza, os peixes da mesma especie ainda esperam pelo necessario estimulo.

Cabe aqui a seguinte reflexão, que demonstra o quanto a injecção de hypophyses age normalmente, sem desvirtuar as peculiaridades especificas. Vimos, ao tratar das curimatãs, que estas, sob influencia da hypophysação, esvasiam os ovarios por completo, tal como essa especie faz na desova natural; as piabas, ao contrario, pertencem ao grupo de peixes que desovam parcelladamente e foi exactamente desse modo que as duas especies amadureceram os ovulos e os soltaram sob a acção das nossas experiencias. Temos pois a certeza de que a hypophysação, tambem sob este aspecto, respeita as subtilezas da physiologia normal.

Pouca coisa teremos de accrescentar a respeito da evolução dos ovos, pois os exemplos acima citados, juntamente com as respectivas microphotographias, esclarecem bem a questão.

A evolução dos ovos das piábas se processa num lapso de tempo que varia principalmente com a temperatura da agua. Fizemos varias experiencias para documentar tal facto e verificamos o seguinte:

Temperatura	Fecundação até eclosão	Perdas
18° C.	36 horas	30 %
23 »	18 »	7 »
28 »	12 »	10 »

Desta forma, a uma differença de 10° C. de temperatura corresponde uma differença de praso de evolução na proporção exacta de 1:3.

Tivemos occasião de verificar tambem a influencia que têm os chloretos e outras substancias sobre a evolução dos ovos e das larvas, ficando a elaboração desse trabalho a cargo do nosso collega M. Vianna Dias, que brevemente dará a conhecer as conclusões das experiencias e os resultados praticos. Foram feitas, além disso, varias provas visando a possibilidade de se fazer o transporte dos ovos embryonados e, comquanto os meios empregados não fossem os mais adequados para tal fim, os resultados não deixaram de ser instructivos.

Evolução das larvas

Ao romper a capsula, a larva mede 2,54 mm. a 2,61 mm. de comprimento e 0,72 mm. de altura; o sacco vitellino mede 0,85 mm. x x 0,62 mm.; a cabeça, rudimentar, apresenta nitidos os olhos e o orgão que constituirá mais tarde o apparelho auditivo; o conjuncto de somitos não alcança o final da cauda; esta é envolvida por uma membrana gelatinosa e algum tanto transparente; não existe ainda abertura buccal; o esophago, o estomago e o intestino estão ligeiramente esboçados; anus fechado, distando a extremidade distal do intestino, do sacco vitellino, 18 somitos.

O coração pulsa 96 a 100 vezes por minuto, porém ainda não ha circulação sanguinea; os batimentos cardiacos vão augmentando gradativamente e, passadas algumas horas, já se podem ver os primeiros globulos atravessando o vitellio. Mais ou menos com 12 horas de vida livre vêm-se os vasos sanguineos assim distribuidos: um superior, que se expande pela cabeça e, passando pela porção posterior do thorax, penetra no vitellio e outro inferior, que conduz o sangue para a parte caudal, porém ao attingir o nivel do ultimo somito, volta mais ou menos em parallelo, para se lançar egualmente no vitellio; o sangue atravessa assim o sacco vitellino sempre na mesma direcção e vae ao coração.

Com 18 horas de vida livre, as larvas se encontram bem mais desenvolvidas; approximadamente 1/6 do vitellio já foi absorvido; a membrana que envolve a cauda soffre uma especie de retracção mais ou menos ao nivel da curva do vaso caudal; o coração bate 150 a 160 por minuto; os vasos da cabeça se ramificam, para irrigar os orgãos cephalicos, que mostram mais claramente os componentes. O vitellio, os olhos e outras porções da cabeça já vão sendo pigmentados. Os somitos se extendem quasi até ao final da cauda.

Após 36 horas de vida livre a larva mede 3,23 mm. e apresenta as nadadeiras peitoraes formadas; circulação muito augmentada, com collateraes para os orgãos da cabeça e entre os somitos, mas o sangue ainda passa pelo vitellio, que está reduzido á metade; esophago, estomago e intestino bem differenciados; esboço dos arcos branchiaes.

Mais duas a tres horas e a mandibula começa a se movimentar; esboço da vesicula natatoria; 24 somitos: 10 á frente do anus, 12 atraz delle, estando os dois restantes, mal differenciados. Tamanho da larva 3,62 mm.

Passadas mais seis horas já se podem ver as protonephridias esboçadas e em breve estará tambem funccionando o interessante *Orgão Adhesivo Characidiano,* ao qual nos referiremos abaixo mais extensamente.

Com 60 horas de vida livre, a larva mede 3,80 mm.; a passagem do sangue pelo vitellio já está quasi supprimida; vesicula natatoria bem desenvolvida; movimentos rapidos da mandibula.

Decorridas 68 horas de vida livre não ha mais circulação vitellina e então o sangue passa pelas branchias; estomago perfeitamente formado, vendo-se bem a sua luz; nove pares de protonephridias bem visiveis: um par na região post-orbital, tres entre o nivel da vesicula até ao anus e cinco dahi até o nivel da cauda; maior pigmentação da cabeça e do corpo da larva; a absorpção do sacco vitellino está quasi finalizada; na vesicula natatoria distingue-se o centro mais claro.

A dentição (Fig. 1) forma-se no terceiro dia de vida livre $(\frac{1\ 1}{2\ 2})$; no maxillar inferior a multiplicação do numero de dentes processa-se mais rapidamente do que no maxillar superior $(\frac{2\ 2}{2\ 3})$ $(\frac{2\ 2}{3\ 3})$ $(\frac{2\ 2}{4\ 5})$ até o 9.º dia, depois a formula passa a ser $(\frac{7\ 8}{5\ 6})$. Não foi determinada a epoca em que se dá a substituição desta 1.ª dentição homodonte, do typo canino, pela dentição especializada, multilobada, caracteristica dos *Tetragonopterineos;* é certo, porém, que tal se dá só muito mais tarde, quando o alevino já ultrapassou 15 mm. de comprimento.

Aos 11 dias de vida livre o tamanho da larva é de 6,17 mm.; esboço de nadadeira dorsal; pigmentação generalizada; alimento encontrado no estomago: 3 *Cyclops*.

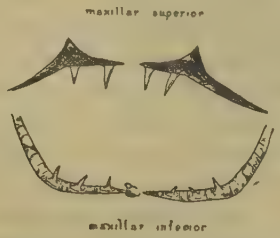


Fig. 1 — Dentição da larva de 3 dias

Fig. 2 — Distribuição das protonephridias na larva de 10 dias. x 15.

As protonephridias acham-se distribuidas da seguinte forma: 9 na região caudal, assim agrupadas (1-4-2-2); 4 ao longo do intestino, sendo os dois anteriores do typo arborecente; 2 ou mais logo atraz da cabeça e 3 ou mais pouco abaixo do olho (Fig. 2).

Mais oito dias e as nadadeiras dorsal, anal e caudal já se encontram formadas, assim tambem a differenciação da vesicula natatoria em parte anterior e posterior e as dobras intestinaes.

Com 23 dias a larva mede 13 mm. Nadadeiras adiposa e ventraes differenciadas; entre o anus e o estomago a membrana ainda possue uma protonephridia arborea em vez de 4, mas ao longo da porção caudal estes orgãos desappareceram; dentição canina, havendo nove dentes no intermaxillar; vertebras bem nitidas, ainda que sem apresentar a forma typica. Está, portanto, praticamente concluida a transformação da larva em alevino.

O Orgão Adhesivo — Durante o espaço de poucos dias apparece, funcciona e desapparece, na larva das piábas, um curioso orgão situado no alto da cabeça, ao qual, por ser talvez homologo ao «adhesive or cement organes» de outras larvas, damos aqui o nome de «*Orgão Adhesivo Characidiano*» e que está figurado na estampa 11, figuras B e C.

Transcrevemos o que a respeito do — adhesive or cement organes — foi dito em synthese na «Bibliography of Fishes» de Dean:

«São orgãos larvaes transitorios, situados junto da bocca, como sulco mediano em crescente ou como um par de botões; são glandulares e destinam-se a auxiliar a fixação, collando o peixe larval a uma base do ambiente».

«De accordo com a primeira descripção dada por REIDHARD e PHELPS (1908) em *Amia* (peixes de organização inferior aos Teleosteos, mais chegados aos ganoides e aos Dipneos), são esses orgãos de origem endodermal, que se formam a principio como bolsas, que em seguida porém se separam e depois se fundem com o ectoderma. Aquelles autores consideram taes orgãos como homologos ao par anterior das cavidades cephalicas dos *Elasmobranchios* (tubarões e raias); J. G. KERR (1906) suggeriu serem possivelmente correspondentes ás cavidades premandibulares dos vertebrados superiores. Nos Dipneos *(Protopterus* e *Lepidosiren)* e nos amphibios, os «cement organes» são aparentemente de origem ectodermal, mas o prof. KERR acredita que neste caso a phase endodermal possa ter sido eliminada do desenvolvimento embryonal.»

Orgãos adhesivos desta natureza foram ainda assignalados em *Polypterus* e *Asipenser,* tambem pertencentes a grupos de organização inferior á dos Teleosteos.

Segundo este resumo, taes orgãos parecem ser caracteristicos das ordens primitivas; falta-nos a necessaria litteratura para melhor orientação, mas ao prof. C. L. HUBBS devemos mais as seguintes informações, segundo as quaes ha tambem orgãos, talvez similares ao que aqui descrevemos, em representantes de varias ordens primitivas dos verdadeiros Teleosteos. Diz-nos o prof. HUBBS em carta: «Não posso de momento citar referencias á constatação de taes orgãos em *Characideos* americanos, ainda que tenha uma vaga ideia de haver lido algo a respeito.

«Se de facto este orgão nos *Characideos* fôr homologo aos de *Amia, Asipencer, Polypterus* etc., isso indicaria uma posição antes primitiva para essa familia. Foram descriptos orgãos provavelmente similares em outros Teleosteos primitivos, como por exemplo em *Hyperopisus* (fam. *Mormyrideos*) e *Heterotis* (fam. *Osteoglossideos);* tambem os — cement organes — de *Sarcodaces,* Characideo africano, foi descripto por BUDGETT. Em minha primeira communicação da «Serie *Cyprinodontes*» mencionei que *Esox* tambem possue um orgão adhesivo mais ou menos desse typo. Se, como penso, todos esses casos se referirem a orgãos homologos, parece justificavel concluir que, numa epoca determinada, todos os Teleosteos primitivos possuiram essa estructura larval, perdendo-a depois cada grupo independentemente.»

São ainda muito fragmentarios os dados que a este respeito offerece o numero reduzido de larvas estudadas. Comtudo quer-nos parecer que se torna necessario distinguir duas series. Uma verdadeiramente primitiva *(Dipneos, Asipenser, Amia),* na qual a posição do que chamamos *Orgam Adhesivo Dipnoino* e tambem seu feitio, até certo ponto, são variaveis, como se lê no resumo acima transcripto da «Bibliography» de Dean; até agora, porém, em todos esses casos, o orgão acha-se situado na parte inferior da cabeça. As larvas de *Protopterus* servem-se do orgão adhesivo situado na região pharyngiana, para fixar-se ás hastes vegetaes do ninho, do mesmo modo nas larvas de muitos amphibios caudados, nos gyrinos, o orgão adhesivo é desse typo e sempre funccional, ficando as larvas durante algum tempo presas ás folhas ou hastes, para assim poderem ficar suspensas na agua sem se movimentar.

O *Orgão Adhesivo Teleostino,* ao contrario, acha-se situado no alto da cabeça e ha egualmente um caso em que se verificou ser elle perfeitamente funccional e util ás larvas; Budgett (Bibl. 2) descreve-o com relação ás larvas de *Hyperopisus* (fam. *Mormyrideos,* Teleosteos, Malacopterygeos da Africa). Estas possuem quatro dessas glandulas no alto da cabeça e duas na fronte; logo ao abandonar o ovo, a larva fica colada ás hastes ou raizes de vegetaes e a mucosidade segregada se estira em fios que, endurecendo, mantêm as larvas amarradas. Budgett pôde ver uma ninhada com alguns milhares de taes larvas, que durante quatro a cinco dias ficaram assim ancoradas, balouçando na agua correntosa.

No caso de *Astyanax* não só a permanencia do orgão adhesivo se restringe a pouco mais de 36 horas, como tambem a funcção não tem mais utilidade para a larva. Pelo contrario, deve elle até certo ponto causar damno, pois que é frequente ver as minusculas larvas debatendo-se para desembaraçar-se do detrito que lhes fica pegado no alto da cabeça, fixado pela substancia viscosa que parece ser segregada pelo orgão; em geral, porém, ao cabo de algum tempo, as larvas conseguem desembaraçar-se daquelle estorvo.

Acompanhando as observações dos assistentes desta Commissão (Bibl. 5) empenhados em traçar o quadro biologico do pequeno *Curimatineo* («saburú» ou «saguirú») em Fortaleza, pudemos verificar que tambem esta especie de Characideo apresenta o orgão do typo teleostino bem desenvolvido, (Est. 11, figs. D e E) differindo, porém um pouco no feitio. Neste caso forma-se a principio uma faixa na região frontal e, elevando-se depois em crista mediana, attinge certo desenvolvimento em sentido transversal; depois ha uma como que con-

centração e o orgão se torna oval. Seu poder adhesivo é um pouco menor que em *Astyanax;* as larvas do Curimatineo menos vezes são embaraçadas pelo detrito adhesivo.

Tambem na larva da t r a h i r a *(Hoplias malabaricus,* subfam. *Erythrininae)* assignalamos o orgão adhesivo cujo desenvolvimento maximo é attingido com 36 horas de vida livre; sua posição, mais chegada á bocca do que ao vertice, é caracteristica; a estructura porém parece identica á dos *Tetragonopterineos.*

Nas larvas do a r a c ú *(Leporinus,* subfam. *Anostomatineos)* não ha nem mesmo esboço do orgão adhesivo, como verificou o Dr. Luis Canale, assistente desta Commissão e que publicará a respeito desta especie trabalho analogo aos da presente serie.

Pela escassez de dados, o confronto destas verificações ainda não permitte conclusões referentes ás affinidades das subfamilias dos Characideos. Do presente ponto de vista os *Tetragonopterineos, Curimatineos* e *Erythrinineos* evidenciam maior affinidade entre si, por terem orgão adhesivo de feitio mais ou menos identico na phase larval; os *Prochilodineos* e *Anostomatineos,* que não o possuem, poderão figurar, talvez, como subramificações, derivadas de formas mais typicas, ainda providas de orgão adhesivo rudimentar na phase larval.

Movimentação da larva — Quando ainda abrigado no interior da capsula, com 14 a 15 horas de evolução, o embryão formado já começa a se movimentar; é a cauda que maior papel desempenha nesses movimentos, porém de quando em vez todo o corpo do embryão, tal como se fôra irritado, reage, saccudindo-se todo.

Esses movimentos vão-se intensificando e a continuidade delles faz com que a delgada capsula se vá alongando até romper. Sempre é a cauda a primeira porção do embryão que se liberta do envoltorio.

Rôto este, a larva, com ligeiros arrancos, desvencilha-se de todo, para depois permanecer algum tempo quieta, deitada lateralmente, pois o volumoso sacco vitellino é quasi globular.

Locomovendo-se sempre aos arrancos, aos 40 minutos de vida livre, a larva procura subir á superficie da agua, attingindo $1\,^1/_2$ cm. e descendo quasi só por gravidade; após ligeiro descanço no fundo da cuba, sóbe novamente, attingindo então $3\,^1/_2$ a 4 cms. de altura com $1\,^1/_2$ a 2 horas de vida. A' medida que as horas passam, as larvas vão conseguindo maior altura e quando alcançam a superficie, ahi permanecem immoveis, com a cabeça voltada para cima e a cauda em posição obliqua para baixo. Logo mais, começam, com pequeninos impulsos, a nadar alguns centimetros, após o que descançam um pouco na mesma posição ou vão, algumas vezes, ao fundo do recipiente.

Com 20 a 30 horas de vida livre, a larva já nada desembaraçadamente e quanto mais se desenvolve, tanto mais agil se torna, a ponto de não mais ser facil captal-a com vasilha pequena.

Alimentação das larvas — Nos dois primeiros dias de vida livre as larvas se nutrem do sacco vitellino, porém do segundo para o terceiro dia já se deve ir preparando um meio rico em pequeninos organismos, pois o tubo digestivo está completamente formado e a larva, de um momento para outro, pode querer iniciar a sua alimentação á custa do meio externo.

O primeiro alimento consiste em protozoarios e algas e, logo depois, são devorados pequenos *Copepodos,* como *Diaptomus, Cyclops* e outros *Entomostraceos.* Assim tivemos um exemplar de 8 mm. de comprimento, cujo estomago continha 1 *Diaptomus,* outro de 8,5 mm. com 2 *Cyclops* e um terceiro, de 9 mm. com 3 *Diaptomus,* 3 *Cyclops* e 2 *Bosmina.*

Havendo escassez ou falta de alimento no aquario, as larvas maiores atiram-se ás menores e chegamos a observar o seguinte caso, bastante expressivo: um exemplar de 15 mm. de comprimento, por não encontrar alimento adequado, enguliu outro de 10 mm., mas por não lhe caber o bocado todo no estomago, a parte caudal da victima lhe ficava para fora da boca.

Não se deve collocar na agua do vasilhame animaes maiores, nem mesmo daquelles que mais tarde constituirão seu alimento predilecto, pois elles em regra atacam as pequeninas larvas. E mesmo que o alimento vivo seja de diminuto porte, não é aconselhavel collocar-se um numero excessivo num meio restricto, pois nessas circumstancias sempre acontece serem victimados muitos desses frageis peixinhos.

A seguinte experiencia documenta esse nosso conselho: num pequeno ambiente riquissimo em *Cyclops,* isto é, num meio supercondensado, collocamos algumas larvas de 3 a 4 dias de vida. Os *Copepodos* atacaram as larvas, destruindo varias porções da membrana que envolve a cauda. As larvas mais novas ou mais fracas foram completamente destruidas em menos de uma hora. Tivemos impressão identica á do ataque que fazem certas formigas a insectos maiores. Os *Cyclops,* em grande numero, envolvem a larva e chegam a arrastal-a. Outras larvas, companheiras das primeiras, foram lançadas num ambiente muito menos rico; não havia ainda decorrido a primeira hora e já essas larvas apresentavam alguns *Cyclops* no estomago.

Adaptação da especie ao ambiente — Em nossos trabalhos n.º 7, pg. 166 e n.º 8, pg. 21 referimo-nos a dois factos, relativos ao

maior ou menor praso de vitalidade dos espermatozoides, em varias especies de peixes, phenomeno que está ligado a factores de ordem physica do ambiente.

Têm vitalidade mais prolongada os espermatozoides das especies que desovam em aguas paradas e, ao contrario, mais curta, nas especies de aguas correntosas, pois neste ultimo ambiente o encontro dos productos geneticos se torna mais facil.

As piábas, ao executarem os rapidos movimentos de natação em espiral e que comparamos a um «carroussel», agitam a agua violentamente e assim, artificialmente portanto, transformam o ambiente em aguas comparaveis ás correntosas. O artificio de que se valem esses peixes corresponde áquelle de que nos servimos, na fecundação artificial, fazendo rodar a agua no copo; por meio da espiral a agua é mais revolvida do que espalhada e é isso que justamente mais convem, no caso.

Quando tivermos observações sufficientemente numerosas, que permittam conclusões mais seguras a respeito deste interessante thema suggerido por SCHEURING (Bibl. 9), deveremos ter em mente que as piábas artificiosamente conseguem estabelecer ambiente adequado á vitalidade dos seus espermatozoides.

E nesse caso a explicação deverá gyrar em torno de uma adaptação (carroussel precedendo a desova) adequada ao ambiente e á vitalidade dos espermatozoides. O caracter ecologico «carroussel» parece integrado ás 2 especies de *Astyanax* de vasta distribuição, talvez mesmo a todas do mesmo genero e de outros da mesma subfamilia. No «saguirú» *(Characideo* da subfamilia *Curimatineos),* conforme revelou seu estudo nos moldes do presente e a que neste momento procedem varios assistentes da C. T. P. (Bibl. 1), ha uma adaptação ecologica semelhante; ainda que não se trate de um perfeito «carroussel», a movimentação é semelhante e de egual effeito.

Estamos pois em face de mutações collectivas, que, ao que parece, attingem as especies cujo esperma tem prazo de movimentação restricto.

Bem comprehendida e amplamente documentada, essa transformação parallela de um caracter motivada pela ecologia, será ainda um argumento em favor das «modificações do genotypo em concordancia com o ambiente», na expressão de GROBBEN-KÜHN (Bibl. 4, pg. 381).

ZUSAMMENFASSUNG

Zwei Arten der Gattung Astyanax (Fam. Characidae, *Subfam.* Tetragonopterinae) *wurden in Nordost-Brasilien, speciell Campina Grande, Staat Parahyba, nach denselben Gesichtpunkten wie*

Prochilodus argenteus (cf. Bibl. 7) näher untersucht und die betreffenden Beobachtungen in folgenden Kapiteln dargestellt: Nützlichkeit; Arten welche in den Stauseen vorkommen; geographische Verbreitung; Nahrung; Geschlechter, Wachstum und Gewicht; Entwicklung der Eier und der Larven.

Astyanax bimaculatus und A. taeniatus (*) *sind in den Stauseen bei weitem die häufigsten dieser Unterfamilie sowie, mit Ausnahme der Cyprinodontiden, der Fischfauna der ganzen Zone überhaupt. Wegen der Armut an besseren Fischarten werden selbst diese kleinen weissfischartigen Astyanax zu Markte gebracht, frisch oder leicht gesalzen und getrocknet. Besonders wertvoll sind jedoch diese Fischlein im Dienste der Gelbfieber-Vorsichtsmassregeln, denn sie leben oft über ein Jahr lang in den tönernen Behältern, in welchen bis zu 200 l. Wasser für den Hausbedarf aufbewahrt wird.*

Beide Arten nehmen sowohl tierische wie pflanzliche Nahrung gemischt, können aber auch manchmal den Magen nur mit Fadenalgen gefüllt haben. Selten vergreifen sie sich an Fischbrut in freier Natur; sehr gerne nehmen sie Insektenlarven, bis zu Ephemeridengrösse. *Nur einmal wurde beobachtet, wie etliche Astyanax springend über dem gesunkenen Wasserspiegel an Pflanzenstengeln haftende* Spongien *befrassen.*

Tabellen I und II beziehen sich auf Länge, Höhe und Gewicht beider Geschlechter und in Tabelle III sind die mit jeweilig einem Wurfe gefangenen Exemplare nach Geschlecht gesondert. Mit 7 Würfen wurden bis zu 700 Stück Astyanax, im ganzen 3,3 Kilogramm wiegend, gefangen. Tabellen IV und V zeigen Längenfrequenz, aber die Unterscheidung der Jahresklassen durch Schuppenuntersuchung ist noch nicht durchgeführt worden, soll aber demnächst beendet und mitgeteilt werden.

Im Zoolog. Anzeiger (Bibl. 6) wurden schon in der Hauptsache die Beobachtungen über den Laich dieser Fischchen mitgeteilt. Tabelle VI bezieht sich auf Gewicht und Zahl der Eier. Besonders wenn ein starkes Gewitter in Aufzug war, konnte beobachtet werden, dass kurz nachdem die ersten Regentropfen gefallen waren, die Astyanax sich an der Oberfläche tummelten; sicherlich handelte es sich um das Vorspiel des Leichaktes, welches wir als Karussell *bezeichnen. Dieses Spiel, bei welchem das Paar oder auch ein Weibchen und zwei Männchen in schraubenartig aufsteigenden Kreisbewegungen der Oberfläche zustreben, wird vom Männchen des öfteren angeregt. Ist das Weibchen gewillt, so dreht es sich auch im Kreise und das Männchen drückt sich, ebenfalls gekrümmt, ihm an. Das Weibchen spritzt etwa*

(*) In der Abhandlung (Bibl. 6) im Zoolog. Anzeiger, Bd. 111, 1935, wurde diese Art irrtümlicherweise stets als *Ast. fasciatus* bezeichnet.

200-500 Eier ab und das Männchen eine kaum merkbare Wolke Samenflüssigkeit. Wohl alle Eier werden dabei befruchtet, denn es sind uns nie zwischen den aufgefischten Eiern solche aufgefallen, welche nicht die ersten Teilungsstadien durchlaufen hätten. Sowohl bei dieser Gelegenheit, wie auch bei der künstlichen Befruchtung, sah man, nachdem die Leibeshöhle aufgeschnitten wurde, dass nur ein Bruchteil der Eier ausgereift war.

Astyanax wie auch die zwei in den Stauseen vorkommenden Cichliden- Arten und Hoplias malabaricus, sind diejenigen Fische, welche gleich zu Anfang der Regenzeit (Januar-Februar) zu laichen anfangen; aber entgegen den drei letzteren Arten findet man von ersteren immer noch solche Weibchen, welche bis zum Ende der Regenzeit (Mai) noch grosse Ovarien haben.

Das Reifwerden der Fische hier im Nordosten wie auch in Südbrasilien vollzieht sich in Abhängigkeit von den meteorologischen Bedingungen und nur bei der günstigsten Gelegenheit findet die völlige Reifung statt, wobei die Eier von einem zum anderem Tage streifbar und befruchtbar werden.

Dieses Verhalten der Characiden und, wie bis jetzt beobachtet wurde, auch der Nemathognathen, bei wenigstens manchen, erschwert natürlich ausserordentlich die Anwendung der anderswo üblichen künstlichen Befruchtungsmethoden.

Die Hypophyseninjektion, welche unsere Kommission bestrebt ist, zu einer vereinfachten und sicheren Methode der künstlichen Fischzucht auszuarbeiten, wurde an Astyanax, wie an Prochilodus (Bibl. 7), durch Behandlung einer grossen Zahl von Serien erprobt. Exemplare N.º 9112 und 9113, letzteres nach Behandlung geöffnet, ergaben folgenden Vergleich: die Eierzahl pro Gramm wurde durch die Reifung bei N.º 9113 auf die Hälfte herabgesetzt und das Volumen auf das Dreifache vergrössert.

Die Serien H, I, L und N erweisen, dass 5-6 Stunden nach der Hypophysierung die Karussellbewegungen beginnen, eine Stunde darauf findet der Laichakt statt. Bei der vorherrschenden Temperatur von 23º C durchliefen die befruchteten Eier die in groben Zügen beschriebenen Stadien und nach 18 Stunden schlüpften die ersten Larven. Bei 18º verlangsamt sich die Entwicklung auf 36 Stunden; erwärmt man das Wasser auf 28º, so schlüpft die Brut in 12 Stunden.

Serie J bezweckte Kreuzungsversuche, indem (b) Ast. bimaculatus ♀ und Ast. taeniatus ♂ nach Injektion in dasselbe Aquarium gesetzt wurden; beide Geschlechter gerieten in Östrus, mieden sich aber gegenseitig. Auch wurden abwechselnd (c und d) je nur ein Geschlecht derselben Art behandelt; die nicht injektierten Exem-

plare flüchteten vor den sie aufsuchenden in Östrus befindlichen Partnern und es kam nicht zum laichen.

Die Entwicklung der Larven verläuft ebenfalls in schnellem Tempo. Beim Ausschlüpfen messen die Larven 2,54-2,61 mm, bei 0,72 mm Höhe; der Dottersack misst 0,83 x 0,62 mm. Schon 20-30 Stunden nach dem Schlüpfen schwimmen die glasshellen Fischlein ziemlich geschickt. Mit 38 Stunden freien Lebens bewegen sich schon die Mandibeln; 60 stündige Larven messen 3,8 mm und der Dottersack ist fast geschwunden, Schon am 3ten Tage wird die erste Nahrung genommen und zwar Protozooen, Algen und Copepodenlarven. Zur gleichen Zeit bilden sich die ersten Zähne, deren Zahl sich im Unterkiefer bis auf 4 resp. 5 jederseits vermehrt, während oben nur 2 Zähne jederseits stehen; am 9ten Tage vermehren sich letztere bis zu 7 resp. 8, ohne dass sich jetzt deren Zahl im Unterkiefer erhöht. 11 Tage alte Exemplare messen 6,17 mm mit schon angedeuteter Dorsale; die Protonephridien sind jetzt folgendermassen verteilt: 9 im caudalen Abschnitte, 4 längs des Darmes, 2 hinter dem Kopfe und 3 unterhalb der Augen. Mit 23 Tagen und 13 mm Länge ist auch die Fettflosse scharf begrenzt und damit das Larvenstadium mehr oder weniger beendigt.

BIBLIOGRAPHIA

1 — Azevedo, P. de, Dias, M. V. e Vieira, B. B. — 1936 — O saguirú ou piabussú do Ceará *(Curimatus elegans, Characidae)*, em preparo.

2 — Budgett — 1901 — Sarcodaces. Trans. Zool. Soc. London, **16**, 115-136.

3 — Canale, L. — 1936 — O aracú do baixo Amazonas *(Leporinus, Characidae*, subfam. *Anostomatinae)* em preparo.

4 — Claus-Grobben-Kühn — 1932 — Lehrbuch der Zoologie, 10.ª edição. 381.

5 — Ihering, R. von — 1933 — Os peixes larvophagos utilizados no combate á febre amarella e á malaria. Rev. Medico-Cirurgica do Brasil. Rio de Janeiro, **41**, 221-234.

6 — Ihering, R. von — 1935 — Die Wirkung von Hypophyseninjekion auf den Laichakt von Fischen. Zoologischer Anzeiger, **111**, 273-279.

7 — Ihering, R. von e Azevedo, P. de — 1934 — A Curimatã dos Açudes Nordestinos *(Prochilodus argenteus)*. Arch. Inst. Biologico. S. Paulo, **5**, 143-184.

8 — Ihering, R. von e Azevedo, P. de — 1935 — Experiencias com o esperma da curimatã. Annaes da Ac. Bras. de Sciencias, **7**, 19-27.

9 — Scheuring, L. — 1928 — Weitere biolog. und physiolog. Untersuchungen an Salmoniden-Sperma. Zoolog. Jahrbücher, **45**, 651-706.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampas 9 e 10

Evolução de *Astyanax bimaculatus*, desde o ovo recem-fecundado até o embryão prestes a ecluir; na fig. V nota-se o curioso «orgão post-annal», que desapparece horas depois.

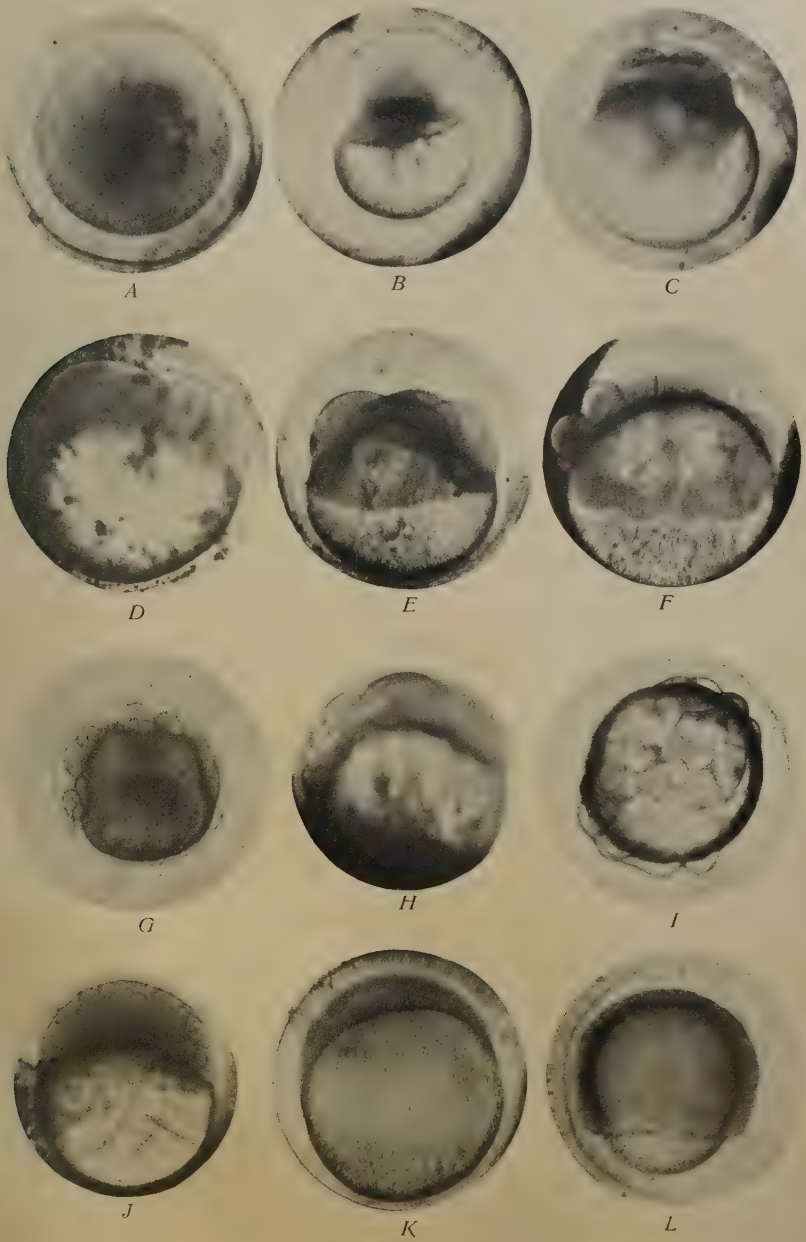
Estampa 11

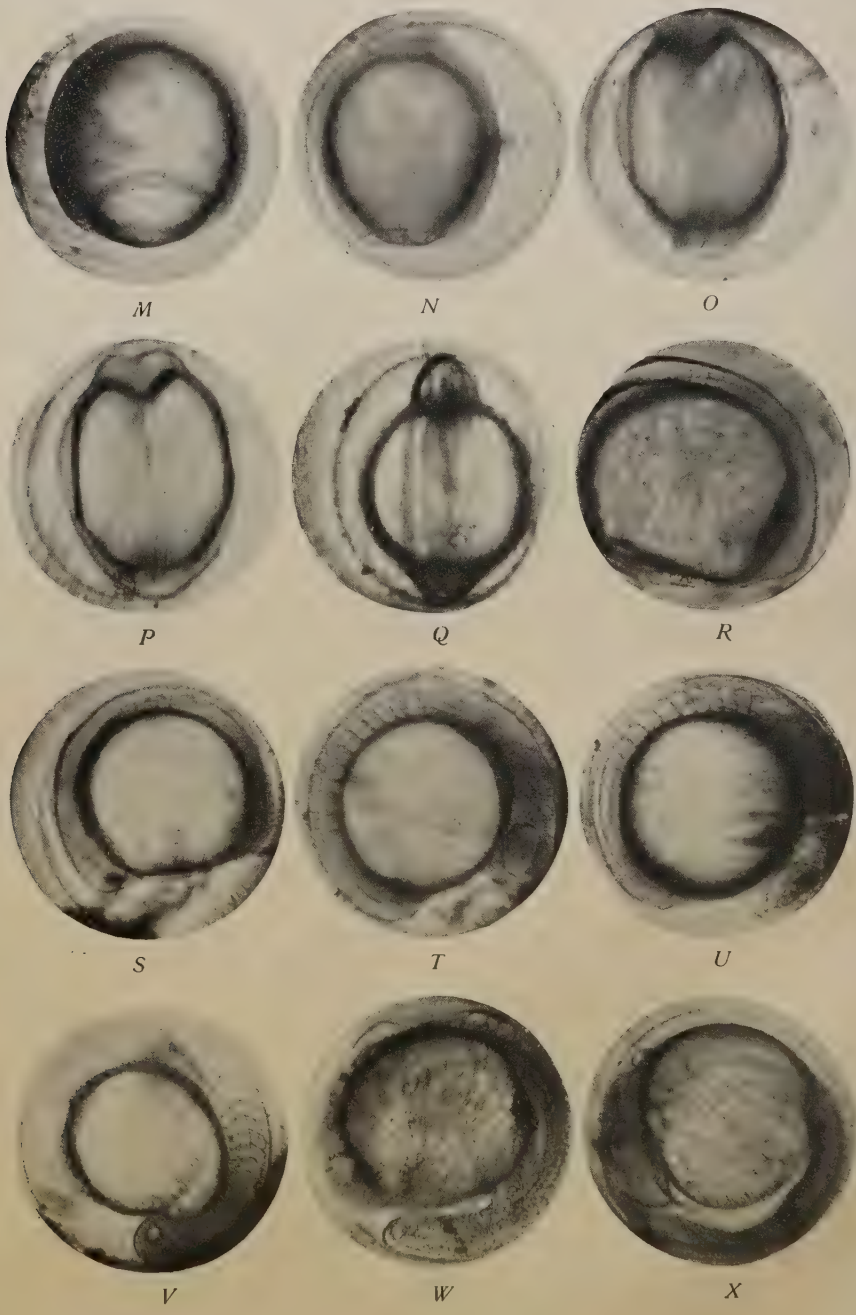
Fig. A — A «piába» do Nordeste ou «lambary do Sul.
» B — Orgão adhesivo da larva de 3 dias.
» C — Idem, sob maior augmento.
» D — Orgão adhesivo da larva de *Curimatus elegans*, com cisco adherente.
» E — Idem, maior augmento.
» F — Cauda da larva de *Astyanax*, de 8 dias, com protonephrideas.

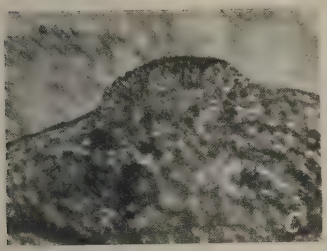
Estampa 12

Fig. A — Ligeiro recorte da membrana, ainda não se formou a parte terminal do intestino.
» B — Recorte maior da membrana; o intestino aproxima-se do recorte que está mais entalhado.
» C — Abertura anal, quasi formada.
» D — Larva mais adiantada; arcos branchiaes e bocca quasi formados.

———o———

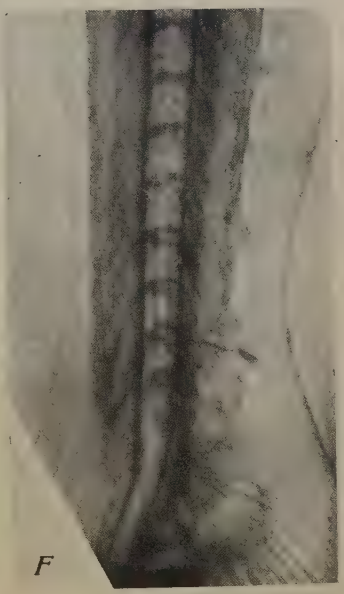

A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L

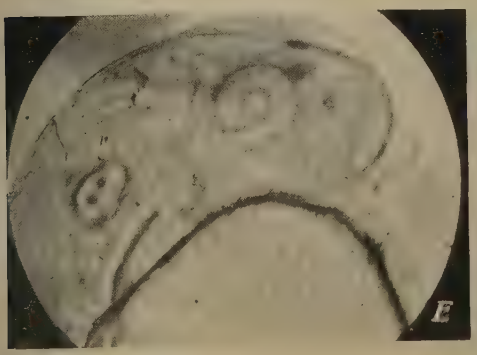

M
N
O
P
Q
R
S
T
U
V
W
X

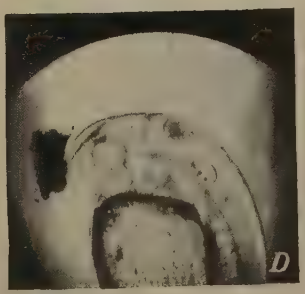


A

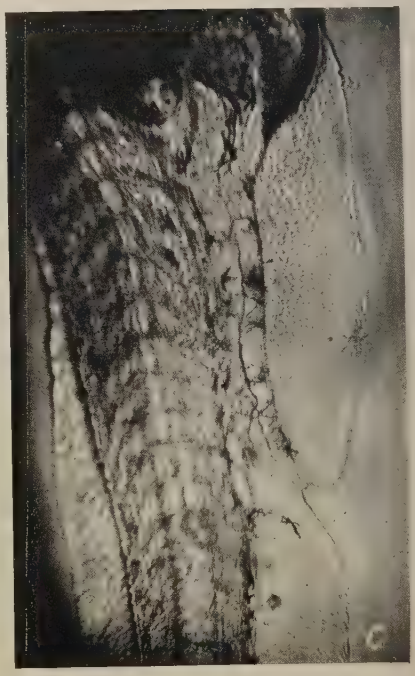
B


F


E


D

A


C

B

D

A DESOVA E A HYPOPHYSAÇÃO DOS PEIXES. EVOLUÇÃO DE DOIS NEMATOGNATHAS

POR

R. von Ihering e P. de Azevedo

Trabalho em collaboração do Instituto Biologico de S. Paulo com a Commissão Technica de Piscicultura do Nordeste

Com as estampas 13-14

As experiencias realizadas pela Commissão Technica de Piscicultura, visando a desova forçada dos peixes, por meio do hormonio hypophysario, abrangem já agora um variado numero de especies. Trabalhando primeiro com curimatãs *(Prochilodus argenteus),* depois com duas especies de piábas ou «lambarys» do Sul *(Astyanax bimaculatus* e *taeniatus),* a respeito das quaes publicamos os artigos Bibl. n.os 7 e 8, apresentamos agora os resultados obtidos com dois peixes de couro, Nematognathas, fam. *Pimelodidae.* Além disso estão em elaboração, a cargo de varios assistentes da Com. Tech. de Piscicultura, publicações referentes a especies pertencentes a duas outras subfamilias de Characideos, a saber: *Curimatus elegans,* «saguirú» (subfam. *Curimatinae)* e *Leporinus,* «aracú» do Amazonas, «piáu» do Nordeste ou «piáva» do Sul, (subfam. *Anostomatinae).* (Bibliographia 1 e 2).

Baseamo-nos, pois, em resultados positivos e concordes, obtidos com 7 especies, pertencentes a 6 generos e que por sua vez fazem parte de 4 subfamilias de *Characideos* e uma de *Nematognathas;* experiencias essas que foram realizadas sob as mais variadas condições, tanto no Nordeste (Parahyba e Ceará) como em S. Paulo e na Amazonia (Pará e Marajó).

Por outro lado devemos relembrar que desde 1927 um de nós tentava por todos os modos obter larvas de peixes em quantidade sufficiente para a criação em tanques; mas como acontecera ao technico norte-americano contractado pela Light & Power Comp. em S. Paulo, os resultados foram nullos, pois raramente o acaso nos fornecia reproductores que tivessem ovulos e esperma perfeitamente amadurecidos; a unica excepção neste sentido foi por um de nós registrada na publicação citada sob Bibl. 5. Aliás já C. Moreira (Bibl. 9) affirmava que «é difficil, talvez impossivel, fixar exactamente a época mais favoravel para esta operação, tanto para os peixes nos rios, em liberdade, como para os que são conservados em viveiros».

A' vista desses continuos insuccessos, procuramos outra solução e para tal fim R. v. Ihering, no Inst. Biologico, em Fevereiro de

1932, (*) tentou obter resultados com a injecção de hormonios. Datam dahi e da subsequente cooperação dos Drs. D. CARDOSO e P. DE AZEVEDO, (Bibl. 3) os estudos para a consecução da desóva forçada dos peixes e cuja viabilidade, á vista dos resultados agora obtidos, damos por demonstrada.

Insistimos sobre a importancia que tem, para a piscicultura nacional, a possibilidade de podermos provocar a maturação dos productos geneticos. Na Europa, segundo SCHÄPERCLAUS, (10) a truta «arco-iris» tem ovulos maduros durante 8 dias e ainda depois disso fornece producto fecundavel, o qual porém, dahi por diante, dá maior porcentagem de machos. Mas de accordo com a sua tabella XII, o mesmo auctor, nos tres annos de 1930 a 32, obteve bons productos durante 31, 12 e 22 dias, respectivamente. Em Buenos Aires o «pejerrey» *(Odonthestes bonariensis)* é pescado para fins de reproducção durante dois mezes consecutivos, pelo menos, e parece que os resultados obtidos são bons.

Entre nós, ao contrario, a opportunidade de se obterem ovulos maduros de Characideos e de Nematognathas limita-se ao momento exacto em que se faz sentir o estimulo exogeno que determina a maturação. Não sabemos ainda qual seja esse factor, mas a experiencia de longa data nos ensina que ella acompanha as chuvas. Talvez experiencias a realizar no mesmo sentido, como as do Porf. TCHIJEVSKI do Instituto de Ionização em Moskou, venham demonstrar a importancia da ionização das aguas (veja-se Bibl. 11).

Como quer que seja, para a piscicultura pratica está resolvida a questão: basta injectar os reproductores, de ambos os sexos, na época em que as gonadas tenham attingido desenvolvimento completo, e a maturação se fará dentro do praso variavel de 5 a 8 horas, conforme circumstancias diversas, ainda não bem definidas e a que mais adiante nos referiremos.

Repete-se sempre o mesmo quadro, com pequenas variantes especificas: recebendo o casal a mesma dose de hypophyses, é o macho o primeiro a sentir-se excitado, emquanto a femea se recolhe a um canto, visivelmente soffrendo as perturbações causadas pela injecção, as quaes externamente mais se manifestam pela grande acceleração dos movimentos respiratorios.

Depois a femea tambem começa a movimentar-se, accedendo aos convites do macho e se este, por acaso, estiver pouco excitado, ella o persegue e instiga.

Apezar das precauções tomadas para elucidar quaes as condições optimas para o methodo da hypophysação, de modo a

(*) Veja-se: «Relatorio semestral», apresentado ao Superintendente do Instituto Biologico de S. Paulo.

garantir o exito, não pudemos ainda estabelecer regras seguras. Certo é que o resultado immediato só se obtem quando os peixes já estão perfeitamente preparados para a desova; antecipando o tratamento, só alguns exemplares desovam, ao passo que outros chegam apenas a manifestar excitação e não desovam, ou só o fazem depois de muito maior praso: 10 a 20 horas após a injecção. O saguirú *(Curimatus)* não se presta a taes observações, porque essa especie, na melhor epoca, pode ser induzida a desovar com o simples alterar das condições de renovação da agua no aquario; testemunhas, passadas do aquario, em que não se fazia renovação continua da agua, para recipientes eguaes aos em que foram postos os casaes injectados, desovaram juntamente com estes, só pelo facto de se fazer circular a agua; não desovaram os exemplares do mesmo lote que havia permanecido no deposito geral, sem agua corrente.

Por vezes surgem outras complicações, cuja interpretação menos facil, ficou em suspenso, podendo o resultado negativo ser attribuido tanto a factores externos, como aos reproductores ou aos doadores de hypophyses.

Por emquanto, para a garantia de exito, a hypophysação deve ser feita exactamente no tempo em que, em plena natureza, os peixes desovam normalmente, portanto, com as primeiras chuvas do verão. Futuramente, talvez possam ser estabelecidas outras condições de exito; desde já, porém, devemos guiar-nos por certas regras geraes de piscicultura, bem documentadas pelos technicos da criação industrial, regras que muito provavelmente devem ter applicação tambem ás nossas especies:

a) Exemplares mantidos durante longo tempo em captiveiro têm gonadas inaptas para a reproducção; tal foi, ao nosso ver, a causa do insuccesso da hypophysação dos dourados do «fish-pound» da Light & Power Comp., os quaes desde 19... estavam presos nesse tanque, relativamente pequeno e sujeitos á alimentação artificial.

b) Ovulos superamadurecidos, como acima ficou dito, dão maior porcentagem de machos; ultrapassando ainda mais o praso util, os embryões apresentam mais frequentemente malformações e, finalmente, as desordens já se manifestam na propria segmentação inicial dos blastomeros.

c) Femeas muito velhas são frequentemente estereis, ou os seus ovulos, quando fecundaveis, com o esperma de machos novos, dão resultados comparaveis aos mencionados no caso — b).

* * *

Ainda não foi devidamente commentada a differença sensivel que se faz notar em duas zonas do Estado de S. Paulo, quanto á epoca da desóva dos peixes.

Nos arredores da capital, incluindo Mogy das Cruzes, Alto da Serra e Jundiahy, a desóva dá-se em fins de Setembro, ao passo que no interior, Pirassununga (rio Mogy-Guassú), Itú (rio Tieté), Piracicaba (rio Piracicaba), os peixes a esse tempo apresentam apenas turgescencia das gonadas, cuja maturação só se dará em Dezembro.

Na primeira das duas zonas mencionadas, que comprehende as cabeceiras do rio Tieté, os pescadores marcaram o dia de São Miguel (29 de Setembro) como sendo a data em que deve realizar-se a desóva e é corrente mesmo a expressão «piracema de São Miguel»; em Pirassununga a piracema foi fixada para o dia 8 de Dezembro (data de N. Senhora) e de facto dahi em diante, até o Natal, em annos de meteorologia normal, todos os peixes estão nas cachoeiras, com ovas bem desenvolvidas e, antes de findar o anno, desovam.

De facto, nossas observações de muitos annos atraz (Bibl. 4), pag. 33) confirmaram essa regra, sempre que a secca do inverno não se prolongava demasiadamente.

Nos arredores da capital de S. Paulo, no anno passado (1935), em fins de Setembro começaram a desovar os *Tetragonopterineos,* e tambem a tabarana *(Salminus hilarii)* fez a piracema; mas o mandy *(Pimelodella)* e o bagre *(Rhamdia)* do rio Pinheiros apresentavam ovas desenvolvidas, porém ainda immaturas.

E' preciso notar entretanto que este rio está sob o controle da Light & Power Comp., cujas manobras de retenção das aguas nas reprezas e subsequente descarga estabeleceram regimen artificial no seu curso. Foi durante o mez de Outubro que aquellas duas especies de Nematognathas desovaram e já em começo de Novembro eram escassos os exemplares ovados. Aliás foi tambem mais ou menos esse o periodo em que desovaram os peixes dos outros affluentes do alto Tieté, onde não houve alteração artificial do curso das aguas.

Observações a serem feitas em annos consecutivos deverão informar se esses peixes de couro sempre extendem a desova por praso assim mais dilatado, como fazem os Tetragonopterineos (lambarys). O contrario verifica-se na tabarana, cuja piracema se realiza de uma só vez, com as primeiras aguas que alagam as varzeas, em Setembro.

Só dois mezes depois os peixes do rio Mogy-Guassú começam a desovar; mas no anno passado (1935), que, meteorologicamente, correu com muita irregularidade, os peixes não formaram a grande piracema espectacular; e de fins de Dezembro a fins de Janeiro, aos

poucos as curimatãs e piábas, os dourados e outros peixes desovaram, ora uns, ora outros, uns parcelladamente, outros de uma só vez.

Por que essa precedencia da desova dos peixes das cabeceiras do rio Tieté?

Não a explica a temperatura, pois esta eleva sua curva mais cedo no interior do Estado do que na Capital e seus arredores; fosse o calor o factor decisivo e os factos se passariam inversamente, determinando desova mais tardia na zona da Capital.

BUSCHKIEL, citando LINSDSTEDT (1916), é de opinião que a procura de oxygenio, mais abundante nas aguas das cabeceiras, possa motivar a migração dos peixes, rio acima. Comtudo parece-nos que só esse factor não basta para explicar cabalmente o phenomeno, como aliás parece comproval-o o exemplo adiante citado, do peixe norte-americano do genero *Thymallus*.

E' regra geral desovarem os peixes dos rios das montanhas, mais cedo que os da planicie. Pode isso ser devido tanto a factores physico-chimicos como a factores biologicos; destes ultimos citaremos o facto de serem os exemplares da mesma especie menores quando criados em aguas pequenas; em sentido analogo poderá manifestar-se a precocidade no desovar.

Ao procurar exemplos de casos analogos ao nosso, somos tentados a utilizar os dados relativos aos Salmonideos da Europa e dos Estados Unidos. Para o *Salmo salar,* o salmão, foi estabelecida a prohibição da pesca, de 11 de Novembro a 24 de Dezembro, por ser esse o periodo da sua desova; mas a truta, *Truta fario* desova de Outubro a Janeiro e mesmo em Março, conforme as localidades e principalmente de accordo com a temperatura, sendo a desova apressada pelo frio. A truta norte-americana, *Salvelinus fontinalis,* desova no outomno em seu paiz natal, mas na Allemanha extende esse periodo de Outubro a Janeiro e tambem a Março.

As trutas «arco-iris» *Salmo irideus* e *shasta* desovam, conforme a zona, de Outubro a Julho (X a XII — Va.; XI a II — Mo.; II a V — Cal.; V a VII — Co.).

Mas estas verificações interessam menos á discussão do nosso caso, visto como varios dos Salmonideos acima citados devem ser considerados, em biologia geral, como especies em formação; sabe-se que as formas ancestraes são de origem marinha, de habitos anadromos e que sua adaptação á permanencia nas aguas frias das montanhas é relativamente recente. Além disso já se pode attribuir á influencia cultural algum desvio da normalidade.

Melhores exemplos fornecem-nos as especies seguintes: *Cristivomer namaycush,* tambem um Salmonideo norte-americano, dos Grandes

Lagos, que desova em Novembro; mas uma sua subespecie, que vive no Lago Superior, mais frio, desova 1 a 2 mezes antes.

Do genero *Thymallus,* da mesma subordem, a especie *T. montanus* habita o Missouri e desova em Fevereiro e Março; *T. ontariensis,* de Michigan, ahi desova em Abril e, mais a jusante, só um mez depois; em Ronan, Rogers Lake, é em fins de Maio e em Georgetown Lake, em começo de Julho que se dá a desova.

O curioso é que tambem esta especie, depois de ter deixado passar o periodo em que o oxygenio é mais abundante na agua, vae, em Junho e Julho, em busca das cabeceiras, para ahi encontrar aguas frias, ricas em oxygenio.

Dos exemplos acima citados tem maior analogia com o nosso caso (desova anterior na zona mais fria) o de *Thymallus.*

No Nordeste do Brasil, onde está excluida a interferencia do factor temperatura, a epoca da desova está em clara relação com as chuvas ou factores a ella ligados (ionização?).

Um acurado estudo pluviometrico, confrontado com as desovas positivamente assignaladas nas duas zonas (capital de S. Paulo e interior), certamente contribuiria para melhor orientação neste problema de alta importancia para a piscicultura.

* * *

Relataremos a seguir as experiencias e as observações feitas em S. Paulo, em fins de 1935, com duas especies de peixes de couro, Nematognathas, ambas pertencentes á mesma subfamilia dos *Pimelodinae,* fam. *Siluridae.*

Pimelodella lateristriga (Müller e Troschel)

Este «mandizinho», de 8 a 13 cms. de comprimento, colhe-se em certa abundancia em quasi todas as aguas menores do municipio da Capital de S. Paulo e sua distribuição extende-se por todo o Brasil meridional. Seu valor no mercado é minimo, mas como ás vezes é pegado com a tarrafa em regular quantidade, elle figura sempre nas bancas juntamente com lambarys e acarás.

Em Setembro de 1935 começamos a examinar os ovarios, que porém ainda não estavam bastante desenvolvidos. Em começo de Outubro as gonadas apresentavam bom tamanho, mas as experiencias de fecundação artificial não deram resultados; a vitalidade do espermatozoide, addicionado á agua, manifestou-se apenas durante 35 a 40 segundos.

Injectando varios casaes, com 1 hypophyse cada (doadores: trahiras, *Hoplias malabaricus* de 20 a 23 cms. de comprimento e

300 a 350 grs. de peso); na manhã seguinte havia quantidade de ovos em evolução no fundo do aquario, emquanto as testemunhas nada apresentavam de anormal. O mesmo material injectado forneceu ovulos e esperma para fecundação artificial, sendo então a duração da vitalidade dos espermazoides de 60 segundos.

Os ovulos immaturos, como nas demais especies estudadas, não se hydratam e permanecem com a mesma dimensão. Estando porém maduros, logo augmentam de diametro, não só pela hydratação, como pela formação de uma espessa camada envolvente, gelatinosa, perfeitamente hyalina, cujo contorno em agua limpa é difficil distinguir; mas por ser essa substancia bastante viscosa, logo adherem a ella todas as particulas de detrictos em fluctuação e dessa forma se torna bem visivel o circulo externo da delicada esphera protectora. O ovo, após a hydratação e incluida a camada gelatinosa, fica com o diametro augmentado de 50 por cento.

Trinta minutos após a fecundação, estava formado o blastodisco, que aos 50 apresentava 2 cellulas; com $6\,^1/_2$ horas o annel germinativo alcançava quasi o polo vegetativo; com 23 horas o embryão apresentava varios somitos esboçados e os olhos em formação; com 28 horas o embryão se movimentava; com 37 horas o coração pulsava 50 a 60 vezes por minuto e ao cabo de 46 horas ecluiam as primeiras larvas.

Outra fecundação artificial, feita alguns dias após, com novo material, tambem previamente injectado, correu de modo identico.

As larvas, ao ecluir, medem 3,5 mm. e têm sacco vitellino mais ou menos arredondado; o coração pulsa 110 vezes por minuto. Decorridas 6 horas de vida livre as larvas sobem nadando até a superficie do recipiente raso, descendo logo por gravidade, sem permanecer em cima, como é o costume das larvas de *Characideos*. Com 26 horas de vida livre estão esboçados os arcos branchiaes; sacco vitellino bastante absorvido; o coração pulsa 130 vezes por minuto. Depois de 48 horas a larva mede 4 mm.; os arcos branchiaes já estão cobertos pelo operculo; o coração pulsa 140 a 150 vezes por minuto e já é minima a quantidade de sangue que passa pelo sacco vitellino; esboçam-se os 3 pares de barbilhões. Com 3 dias o sacco vitellino está quasi completamente absorvido; a pigmentação bastante augmentada e os barbilhões muito crescidos; estomago e intestino perfeitamente formados, inclusive a abertura anal, de modo que as larvas já podem alimentar-se de pequenos seres.

Os maxillares são providos de fina dentição, formada por dentes conicos, muito agudos, cujo numero cresce dia a dia.

Rhamdia quelen (Quoy e Gaimard)

E' este o «bagre do rio» mais commum em São Paulo, bem como em todos os lagos, rios médios e pequenos, do Prata ao Amazonas. Attinge 50 e mais centimetros de comprimento, pesando até 3 kilos; sua carne é flacida, antes insipida, mas onde não ha as especies optimas dos grandes rios, o povo o aprecia bastante, pois em confronto com a trahira, unico peixe maior das mesmas aguas, o bagre leva a grande vantagem de ter muito poucas espinhas. E' facilmente pescado a anzol e com o espinhel, posto de noite, na manhã seguinte é certo ter-se bom numero delles fisgados; curioso é que, ao abocanhar a isca, muitas vezes este peixe leva o bocado até o estomago e deixa-se ficar quieto, sem reagir. Nas reprezas da Light & Power Comp., em Santo Amaro, ha pescadores que extendem kilometros de fio, com um milheiro ou mais de anzoes e, de madrugada, levam centenas de bagres e de trahiras para o mercado. Em summa, sem ser peixe de qualidade, ainda assim o bagre tem, como a trahira, certo valor na economia do povo que habita zonas percorridas por pequenos affluentes dos grandes rios.

«*Jundiá*», nome indigena correspondente a «bagre» em portuguez, applica-se ás especies cujos aculeos não são pungentes, ao passo que os «mandys» têm ferrões serrilhados, perigosos mesmo para quem não está habituado a lidar com esses peixes. Jundiá é tambem pronunciado «*Jandiá*» ou «*Nhandiá*» e, devido a algum erro de escripta ou typographico, passou a designar o genero.

Em 26 de Outubro de 1935 encontravamos no rio Pinheiros, em S. Paulo, femeas com ovarios bem desenvolvidos; uma dellas chegou a soltar os ovulos á mais ligeira compressão; os machos tinham «leite» fluido e abundante e a vitalidade dos espermatozoides era de 55 a 60".

Feita a fecundação artificial, ao cabo de 1 hora e 15' estavam formadas as 2 cellulas da primeira divisão; com 22 horas o embryão estava esboçado; com 24 h. estavam esboçados a cabeça e a cauda; com 26 h., apresentava o embryão 8 somitos; com 32 h. havia 20 somitos; depois de 46 h. o embryão estava preparado para ecluir e, certamente, em agua mais movimentada, teria iniciado a vida livre, pois que nessas condições a membrana envolvente se rompe mais facilmente.

Na mesma data foram injectados dois casaes, cujas femeas ainda não tinham ovulos maduros a ponto de poderem fluir sob compressão. A dose injectada foi de 2 hypophyses por exemplar. O esperma, 24 horas após, era fluido e abundantissimo e a vitalidade ascendeu a 75 segundos. Um dos exemplares desovou durante a noite, tendo havido

fecundação natural. Outra femea forneceu material para a fecundação artificial, ovos esses cujas larvas nasceram 35 horas após; mas algumas larvas do mesmo lote demoraram mais 8 horas para ecluir. A temperatura média da agua nos aquarios foi de 18-19º C.

Com 24 horas de vida livre a larva já apresentava arcos branchiaes esboçados, que se alongavam externamente; o sacco vitelino grande, arredondado, côr de champagne, começava a pigmentar-se. As larvas apoiavam-se no fundo do aquario, ficando em regra voltadas lateralmente. De tempo em tempo agitavam-se e, movimentando-se rapidamente, alcançavam a superficie da agua do pequeno recipiente, mas desciam logo sem fazer movimentos.

Depois de 38 horas surgem como côtos os futuros barbilhões; a mandibula executava movimentos masticatorios; havia 150 batimentos cardiacos por minuto.

Decorridas 60 horas o sacco vitellino estava todo absorvido e a circulação já não o atravessava; notava-se um começo de heterocerquia interna. Por estarem em condições de se alimentar de plancton, foram essas larvas levadas para diversos aquarios, onde lhes davamos alimento colhido com rede de plancton.

A esse tempo, nas larvas de diversas subfamilias de Characideos, forma-se na parte superior da cabeça o «orgão adhesivo teleostino», ao qual nos referimos mais minuciosamente ao estudarmos as larvas de *Astyanax* (Bibl. 8). Nas duas especies de Nematognathas, aqui referidas, tal orgão não se forma, o que não deixa de ser significativo; mas é preciso ainda estudar mais variada representação de outras subfamilias de peixes de couro, para chegar a conclusões quanto ás affinidades que a presença ou ausencia desse orgão larval poderá revelar.

Com 8 dias de vida livre essas larvas mediam 7,6 mm. de comprimento; a dentição apresentava a formula $\frac{2-3}{4-5}$ para cada ramo maxillar; o intestino apresentava uma dobra logo no inicio. A margem livre da membrana vertical que envolve o dorso e o ventre estava toda pontilhada por pequenos corpusculos refringentes, que formavam uma linha submarginal, excepto na zona onde deveria ficar a nadadeira adiposa.

A larva de 13 dias media 12 mm. de comprimento por 2 mm. de altura na cabeça; a nadadeira dorsal, pelos entalhes da membrana e pelos raios esboçados, estava em formação, ao passo que na anal esse processo ainda estava em começo; os corpusculos submarginaes da membrana ainda existiam, sendo mesmo bem nitidos na dorsal. A alimentação já abrangia formas maiores, como sejam pequenas larvas de Chironomideos; além de uma destas, um dos peixinhos havia ingerido mais 20 pequenos Cladoceros.

E' de suppor que, devido á insufficiencia das installações, aliás adaptadas ás pressas, o desenvolvimento dessas larvas não corresponde á boa media de crescimento dessa especie; no ambiente natural é provavel que a curva de crescimento suba mais rapidamente. Neste sentido a melhor prova foi a que pudemos obter em Campina Grande, onde os alevinos da curimatã, nascidos em data bem documentada, cresceram á lei na natureza e em 23 dias attingiram 22 mm. e em 53 dias de edade mediam 70 mm. (Bibl. 7, pag. 153, graphico).

Ao Dr. P. SAWAYA, que, ao tempo em que realizamos o presente trabalho, dirigia o Laboratorio de Zoologia da Faculdade de Sciencias de S. Paulo, em substituição ao fallecido Prof. E. BRESSLAU, devemos agradecer o cordial acolhimento que nos dispensou, pondo á nossa disposição não só o laboratorio, como tambem uma serie de aquarios e a camara photographica. Os demais trabalhos foram executados no Instituto Biologico de São Paulo.

ZUSAMMENFASSUNG

Da jetzt schon 7 Arten einheimischer Fische (Characiden und Nematognathen, 5 Unterfamilien angehörig) bezüglich der Wirkung der Hypophyseninjektion untersucht worden sind und bei allen guter Erfolg erzielt wurde, kann diese Methode als allgemein anwendbar betrachtet werden. Eingehender wurde im «Zoolog. Anzeiger» (Bibl. 6) der Grund besprochen, welcher eine derartige Umgehung der in fischereitechnischer Hinsicht sonst entstehenden Schwierigkeiten nötig machte.

Im Staate S. Paulo sind, in Bezug auf die Zeit, zu welcher die Fische volle Laichreife erreichen, zwei scharf getrennte Regionen zu unterscheiden. Im Oberlaufe des Tieté-Flusses, also in der Umgegend der Hauptstadt und überhaupt westlich von Jundiahy, laichen die Fische in normalen Jahren stets gegen Ende September und behaupten die Fischer, dass dies im Zusammenhang mit dem Namenstage des Heil. Michaels (29. Sept.) geschehe. Hingegen kommen die Fische der östlichen Region (Mittellauf des Tieté, vom Itú-Wasserfalle abwärts, sowie des Mogy-Guassú- und Piracicaba-Flusses) erst gegen Anfang Dezember zur Vollreife (2. Dezember, Heil. Jungfrau) und je nach den Regenverhältnissen entleeren alle Fische ihre Gonaden bis Weihnachten; doch kann es bei weniger normalen meteorologischen Bedingungen auch bis Ende Januar oder Mitte Februar dauern bis die einzelnen Weibchen die Eierstöcke, und dann meist portionsweise, entleert haben. In letzterer, östlichen Region setzt aber der Sommer früher ein als in der kälteren Umgebung der Hauptstadt; jedenfalls müssen aber noch die Laich- und Regenperioden auf einen eventuell vorhandenen Zusammenhang hin verglichen werden.

Als im Oktober vorigen Jahres die Fische der Umgebung S. Paulos gut entwickelte Gonaden aufwiesen, unterzogen wir zwei Stachelwels-Arten der Hypophysenbehandlung; wie erwartet, lieferten diese befruchtbare Eier, wohingegen die unbehandelten Exemplare gleicher Art keine streifbaren Eier hatten und lange nachher in diesem unreifen Stadium verblieben.

Die Eier beider Arten vergrössern ihren Durchmesser nicht nur durch das Aufsaugen von Wasser, sondern werden ausserdem nach der Befruchtung noch von einer glasshellen gelatinösen Substanz umgeben, welche das Ei sehr wirksam polstert.

Die Entwicklung verläuft bei beiden Arten in ca. 35-40 Stunden, bei 18-19 Grad Durchschnitts-Temperatur; während der zwei ersten Tage findet eine grosse Reduktion des Dottersackes statt, so dass am dritten Tage die Larven schon sehr behend schwimmen; zu dieser Zeit öffnet sich auch der Darm nach hinten und es wird die erste Planktonnahrung aufgenommen. Die Larven konnten nur während einiger Tage gut gepflegt werden; ihre Schnellwüchsigkeit ist aus den täglich aufgenommenen Photographien zu ersehen.

BIBLIOGRAPHIA

1 — Azevedo, P. de, Dias, M. V., e Vieira, B. B. — 1936 — O saguirú ou piabussú do Ceará *(Characidae, Curimatinae)* em preparo.

2 — Canale, L. — 1936 — O saguirú do baixo Amazonas *(Characidae, Anostomatinae)* em preparo.

3 — Cardoso, D. M. — 1934 — Relação genito-hypophysaria e reproducção nos peixes. Arch. Inst. Biologico, **5**, 133-136.

4 — Ihering, R. von — 1929 — Da vida dos peixes, 8.º, 150 pgs., Comp. Melhoramentos, S. Paulo.

5 — Ihering, R. von — 1931 — A desóva da «Ferreirinha» *(Characidae, Anostomatinae)*. Rev. de Biologia e Hygiene, S. Paulo, **2**, 205.

6 — Ihering, R. von — 1935 — Die Wirkung von Hypophyseninjektion auf den Laichakt von Fischen. Zoologischer Anzeiger. **111**, 273-279.

7 — Ihering, R. von e Azevedo, P. de — 1934 — A Curimatã dos Açudes Nordestinos *(Prochilodus argenteus)* Arch. Inst. Biologico, S. Paulo, **5**, 143-148.

8 — Ihering, R. von e Azevedo, P. de — 1936 — As Piabas dos Açudes Nordestinos *(Characidae, Tetragonopterinae)*. Arch. Inst. Biologico, 7, 75-106.

9 — Moreira, C. — 1921 — A Piscicultura no Brazil. Rio de Janeiro, 13 pags., 2 figs.

10 — Schäperclaus, W. — 1933 — Lehrbuch der Teichwirtschaft. P. Parey, Berlin, 289 pgs.

11 — Tchijevski, A. L. — 1935 — Aeroionisação em medicina. Gazeta Clinica, S. Paulo, anno **33**, 117-123.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampas 13 e 14

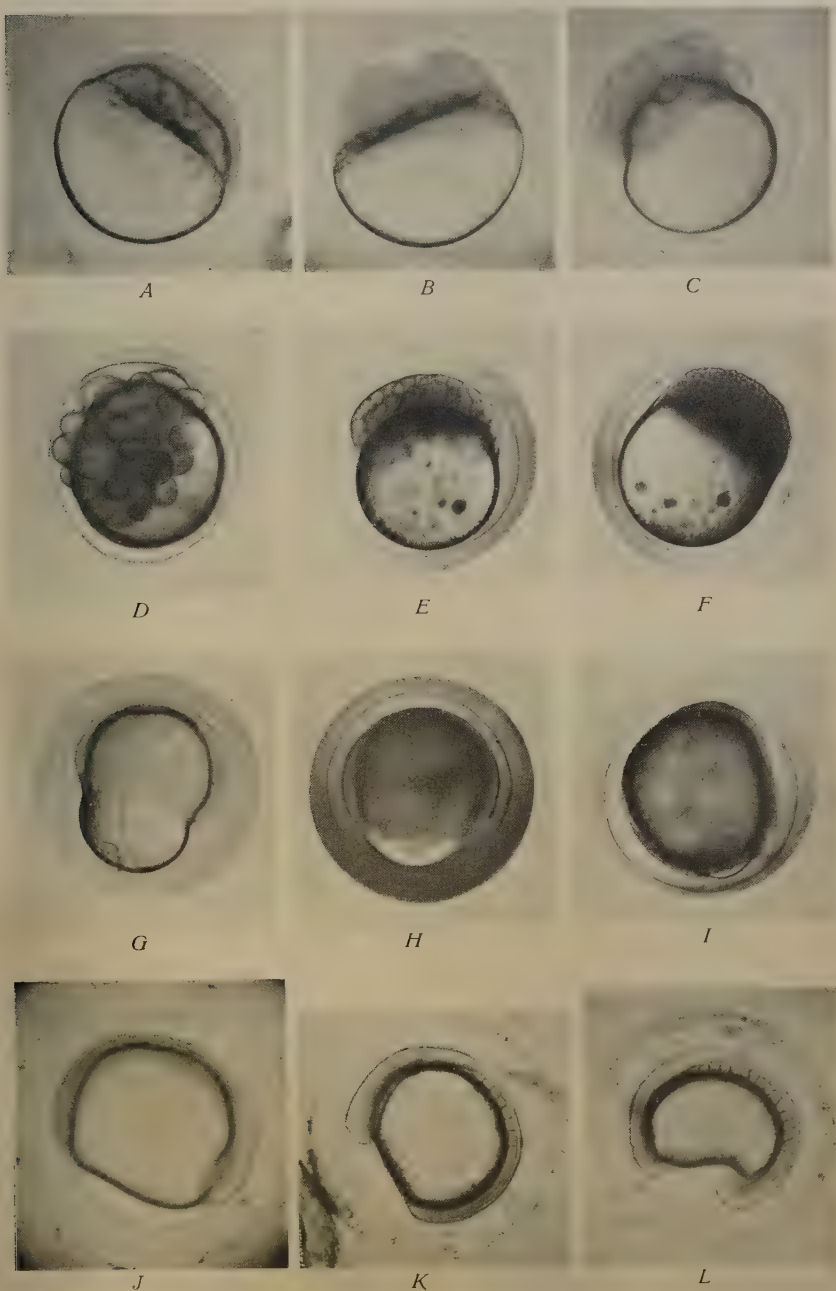
Figs. A a N — Evolução de *Pimelodella lateristriga*, desde o ovo recem-fecundado, com o blastodisco em formação, até a larva prestes a ecluir. Só nas figs. A, J a L e N se vê a esphera gelatinosa que envolve o ovo. Na fig. M nota-se o «orgão postanal» que, horas depois, não existe mais.

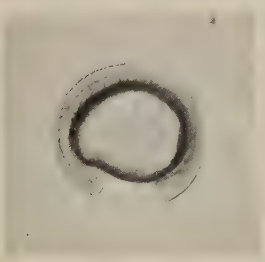
Fig. O — Larva recem-ecluida.

Figs. P a T — Microphotographias tiradas com 24 horas de intervallo, em fig. T a larva está pois com 5 dias de vida livre. Por motivos technicos foi preciso usar augmentos differentes, pelo que os tamanhos das figuras não são proporcionaes.

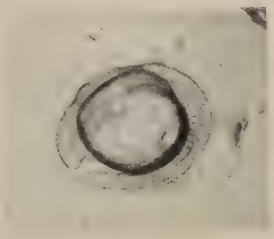
Fig. U — Larva de *Rhamdia quelen* com 6 dias de vida livre (muito augmentada).

———o———

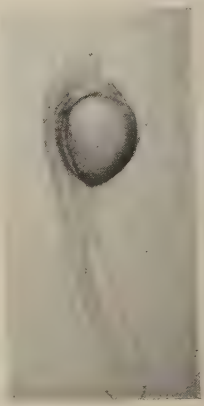

A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L



M

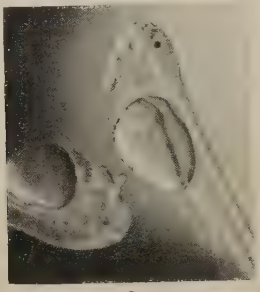


N



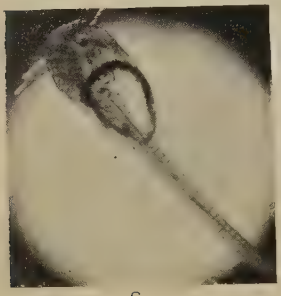
O

P



Q

R



S

T

U

Vol. 7 — Art. 10 Novembro de 1936

NOVO ADENOCARCINOMA TRANSPLANTAVEL DO CAMONDONGO

POR

J. R. Meyer e J. Saborido

Trabalho do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 15-20

Em Abril de 1934, recebemos um camondongo da criação do Instituto Biologico de S. Paulo, o qual era portador de um tumor bosselado da região mammaria direita.

O tumor, que media 4 x 1,6 x 1 cms., extendia-se do pescoço até a região inguinal correspondente e, ao ser aberto, deixava escorrer um liquido espesso, amarello claro ou roseo. Uma parte do tumor foi fixada em liquido de ZENKER e posteriormente examinada, revelando a pesquiza microscopica, que o tumor referido era um adenocarcinoma. Transcrevemos a seguir o relatorio do quadro histo-pathologico do material do tumor, que recebeu o numero 2.906 na Secção de Anatomia Pathologica.

No tecido tumoral ha um estroma conjunctivo, portador de vasos, formado por traves de diversas grossuras, as quaes, entrelaçando-se entre si, dão origem a grande numero de cavidades acinosas, revestidas por um epithelio atypico. O epithelio em questão é formado por cellulas relativamente grandes, polymorphas. Estas mostram protoplasma denso, de limites pouco nitidos e nucleos arredondados ou ovaes. Estes ultimos variam muito no tamanho e na densidade. Em geral, porém, são transparentes, e limitados por uma membrana cheia de pequenas granulações chromaticas. Sua distribuição tambem é bastante irregular; ora elles se dispõem em uma camada unica, ora se sobrepõem uns aos outros formando massas irregulares que se projectam para o interior das cavidades glandulares. Não raro, essas cellulas enchem completamente os acinos, formando blócos epitheliaes massiços; outro caracter muito digno de nota consiste em não estarem os elementos epitheliaes separados dos tecidos conjunctivos subjacentes, por membrana basal nitida. Antes, as cellulas em questão se implantam directamente no tecido conjunctivo do estroma, invadindo-o mais ou menos profundamente. Nas vizinhanças das cavidades acinosas, é frequente encontrarem-se pequenas estructuras epitheliaes solidas, enchendo as frestas do tecido conjunctivo, dando a impressão de se terem destacado dos acinos, em consequencia de um caracter francamente infiltrativo no seu modo de crescer. As figuras de mitose são muito frequentes entre os elementos epitheliaes. No interior das cavidades que não estão cheias de cellulas, percebe-se um material contendo restos de nucleos e elementos epitheliaes destacados, em necrobiose. Em diversos campos ha extensas areas de necrose.

O material foi dividido em pequenos fragmentos, os quaes foram enxertados por incisão, no dorso de 12 camondongos novos.

Resultaram 2 tumores, um dos quaes, foi inoculado a 20 outros camondongos, produzindo diversos nodulos metastaticos nos pulmões. Nesta segunda serie houve 4 resultados positivos, que deram material para novas inoculações, as quaes se continuam até agora, quando o tumor já conta mais que 40 passagens. Neste tempo sua porcentagem de resultados positivos augmentou gradativamente até chegar por vezes a 100 %, e seu aspecto histologico se modificou profundamente (Estampas 17 e 18), desapparecendo de todo o aspecto adenocarcinomatoso que persistira cada vez mais reduzido até a 9.ª passagem, dando lugar depois, a um verdadeiro sarcoma fuso-cellular (Estampas 19-20).

E' este tumor transplantavel do camondongo, o segundo tumor autochtone transplantavel que se descreve e que se mantem em serie no Brasil. Material histologico foi enviado ao Dr. W. C. Woglom do Instituto de Cancerologia de Nova York, que o identificou como sendo de um «adeno carcinoma», dizendo textualmente: «*The tumor which you sent me is a typical mammary adenocarcinoma of the mouse*».

O apparecimento ulterior de um aspecto sarcomatoso não é novidade em cancerologia. Diversos autores descreveram tumores epitheliaes, nos quaes se observou essa «transformação» do primitivo carcinoma em um tumor unicamente conjunctivo. Ha assim uma observação de Ehrlich e Apolant com um adenocarcinoma transplantavel do camondongo, o qual em sua 10.ª geração apresentou, ao lado do quadro original, areas sarcomatosas, e depois da 13.ª não mais mostrou elementos epitheliaes. Em outras observações os mesmos autores referiram dois casos interessantes. O primeiro é o de um tumor resultante da inoculação de uma mistura de 4 tumores epitheliaes, o qual entre a 12.ª e 14.ª gerações apresentou o quadro de um neoplasma conjunctivo. O segundo caso foi observado com um dos 4 tumores acima referidos, o qual, transplantado isoladamente, modificou seu aspecto histologico a partir da 50.ª geração, para se tornar puramente sarcomatoso na 68.ª.

Loeb, estudando um adeno-carcinoma da glandula sub-maxillar de um camondongo japonez, verificou, já na primeira geração, o apparecimento do aspecto sarcomatoso; seus estudos não foram continuados além da 2.ª geração por falta de camondongos japonezes, unicos nos quaes o tumor era transplantavel.

Liepmann, por sua vez, refere um carcinoma do camondongo que na 8.ª passagem tomou o caracter de um carcinoma sarcomatoide. E' muito conhecido o caso do tumor «37» do camondongo, de Bashford, Murray e Haaland que, sendo primitivamente adenocarcinoma, se mostrou sarcomatoso a partir da 7.ª e 8.ª gerações.

Lewin observou o quadro sarcomatoso na quinta geração de um adenocarcinoma keratinisado do rato. Russell tambem o registrou durante as passagens de um adenocarcinoma mammario do camondongo, de typo hemorrhagico.

Clunet fez a mesma observação em um cysto-adenoma mammario maligno do camondongo, no qual a transição foi completa na 6.ª geração. Finalmente, Redaelli e Gaetani assignalam a modificação sarcomatosa após 42 passagens de um carcinoma do pescoço de um camondongo. No nosso caso o caracter sarcomatoso do estroma já era bem nitido na quarta passagem, não sendo possivel depois da nona passagem, reconhecer nenhum elemento de caracter epithelial.

A transformação desses tumores em um typo histologico differente do original tem um grande interesse sob o ponto de vista theorico por se prestar a considerações relativas a pathologia dos tumores.

Uma primeira questão que surge ao se observar uma mudança no quadro histologico de um tumor é a de se saber se semelhante transformação é uma metamorphose das cellulas transplantadas ou se, em vez de uma metamorphose, em taes casos é um novo tumor que se forma a custa das cellulas do hospedeiro que recebeu o transplante. No primeiro caso poder-se-ia aventar duas possibilidades. Pelo evoluir intenso das cellulas transplantadas, os elementos epitheliaes perderiam o caracter epithelial commum, adquirindo aspectos sem indicios de disposição acinosa, constituindo os chamados cytoblastomas ou meristomas ou então, seria uma activação dos poucos elementos conjunctivos, do proprio estroma do adenocarcinoma que, soffrendo uma excitação do seu poder proliferativo, poderiam adquirir o aspecto e o caracter de verdadeiros sarcomas.

Contra a ideia de que o tumor de caracter fibrosarcomatoso seja formado a custa da multiplicação das proprias cellulas do tumor enxertado, poderiamos citar os interessantissimos achados de Andrewes que, trabalhando com o tumor de Sheffield proprio da gallinha, mas, transplantavel ao faisão (especie heterologa), conseguiu demonstrar, por meio de reacções sorologicas, indicios bastante evidentes que nos casos de transplante heterologo o tumor formado é constituido a custa das cellulas do novo hospedador e não a custa de elementos da especie que forneceu o inoculo.

Sabe-se que Ribbert attribuiu a origem dos carcinomas a uma alteração no equilibrio existente entre os tecidos epitheliaes e os conjunctivos. A diminuição da resistencia do tecido conjunctivo, segundo esse autor, tornava possivel sua invasão pelos epithelios, os quaes seriam então rodeados e isolados pelo tecido invadido. Em resumo, o crescimento epithelial que caracterisa histologicamente um carcinoma

não seria sinão a consequencia de uma alteração primitiva dos tecidos conjunctivos visinhos. O facto frequente de, nos adenocarcinomas mammarios transplantaveis do camondongo, dar-se o desapparecimento da parte epithelial á medida que se fazem transplantes successivos, poderia constituir uma confirmação experimental da theoria de RIBBERT. Nesses casos o tecido conjunctivo tornar-se-ia mais activo e sobrepujaria a tal ponto a porção epithelial, que esta seria incapaz de luctar contra a concurrencia offerecida pelo primeiro. Outra noção interessante que decorre dessas observações é o conceito que se deve formar a respeito dos tumores malignos da serie epithelial. Segundo a opinião correntemente admittida, estes ultimos são formados por um parenchyma epithelial maligno e por um estroma conjunctivo benigno que lhes serve de sustentação. A frequencia com que os adenocarcinomas mammarios do camondongo, no decorrer das passagens, se «transformam» em sarcoma, nos induz a crer que se trate, nesses casos, de uma malignisação progressiva de elementos conjunctivos primitivamente normaes do hospedador e não da exacerbação de uma malignidade existente *ab initium*. Os «adeno-carcinomas» mammarios e transplantaveis do typo descripto seriam portanto tumores epitheliaes no sentido commum da palavra (tumores formados por cellulas epitheliaes malignas, sustentadas por um estroma conjunctivo benigno), e não tumores mixtos (isto é, tumores dotados de uma parte epithelial maligna sustentada por um estroma conjunctivo tambem maligno). Em favor dessa interpretação apontamos dois factos. Primeiramente o aspecto cellular denso e nitidamente differenciado da parte conjunctiva do tumor primitivo que deu origem á serie obtida por transplantes e, em segundo lugar, a observação muito conhecida dos adenocarcinomas do tubo gastro intestinal humano que, sendo typicamente epitheliaes, dão metastases nos ovarios, formando o chamado «tumor de Krukenberg», que como é sabido, além das «cellulas em sinete», tem areas de aspecto francamente sarcomatoso, as quaes pódem ser interpretadas, como cellulas ovarianas malignisadas.

Embora ainda não não haja dados experimentaes para se fazer juizo definitivo sobre este assumpto, é possivel que o caracter epithelial ou sarcomatoso dos tumores secundarios dependa das condições ambientes offerecidas pelo tecido em que elles se desenvolvem. Se as metastases (compostas de cellulas malignas epitheliaes e conjunctivas), cahirem num orgão onde as condições forem mais favoraveis ao desenvolvimento das cellulas epitheliaes (pulmão, por exemplo), o tumor assumirá um caracter epithelial. Se ficarem num ponto em que o desenvolvimento das cellulas conjunctivas fôr maior (tecido cellular sub-cutaneo ou ovario) o caracter do tumor será sarcomatoso. Pelo

que se vê, o tumor epithelial traria em si um factor que, em se adaptando ás cellulas conjunctivas em proliferação activa, provocaria a malignisação destas ultimas e assim, não haveria uma transformação do tumor, mas uma verdadeira substituição do carcinoma por um outro tumor de typo histologico differente.

Corroborando a interpretação dada para o phenomeno convem lembrar que a hypothese de uma malignização de cellulas normaes á custa de um agente ainda pouco conhecido (Ens malignitatis), está de perfeito accordo com o que se tem observado ultimamente em um certo numero de tumores passiveis de reproducção mediante inoculação de material filtrado, isento de cellulas.

A noção de que um tumor resultante de transplantação de outro seja o resultado não da multiplicação das cellulas transplantadas, mas, da «malignização» das cellulas do novo hospedador tem o apoio do que foi observado por F. Blumenthal, Auler e Solecka (citados por C. Lewin) os quaes conseguiram reproduzir o sarcoma de Jensen, inoculando animaes sãos com baços normaes de portadores do tumor.

Tomando-se em consideração, além disso, as observações de Pentimali (loc. cit.) que conseguiu provocar tumores malignos em pontos submettidos á acção do thermocauterio e mediante injecção de filtrados de tumor, se levarmos em conta o facto de que os tumores malignos provocados pelo pixe e derivados (carcinomas e sarcomas) se desenvolvem no ponto de applicação de taes productos, se nos lembrarmos ainda de que, no caso dos tumores parasitarios do rato, os neoplasmas apparecem ao redor dos vermes que com elles coincidem, então seremos levados a admittir com B. Fischer Wasels a grande importancia que tem para o apparecimento desses tumores, a existencia de cellulas normaes em multiplicação. De accordo com numerosas observações tudo leva a pensar que o tumor maligno não é o resultado da actuação de uma causa simples, mas o resultado da acção combinada de um factor com uma determinada circumstancia. O factor seria o agente filtravel (virus) e a circumstancia, a presença de um grupo de cellulas normaes em proliferação activa.

O factor isoladamente, encontrando cellulas em repouso não se desenvolveria e acabaria por desapparecer sem deixar vestigios. Encontrando, porém, cellulas em multiplicação mais ou menos intensa como por ex. tecidos embryonarios (caso de tumores congenitos), fócos de inflammação chronica (traumas e irritações antigas, Raios *X*, pontos parasitados pela Spiroptera, etc.) ou experimentalmente inflammados por diversos processos de laboratorio (applicação de pixe, injecções de di-benzo-pyreno, enxertos neoplasicos, injecções de filtrados ou mesmo de cellulas normaes, etc.), esse factor abrigar-se-ia no interior das

cellulas recem-formadas e ahi iria continuar o seu desenvolvimento. Nesses casos então as cellulas deixariam de se multiplicar segundo as leis normaes e passariam a crescer de um modo anomalo, constituindo o neoplasma de que formam o substracto anatomico.

ABSTRACT

A new transplantable tumor of the mouse

In this paper a new transplantable tumor of the mouse is described. This tumor is one of mammary origin. At the begining it had the microscopical character of an adeno-carcinoma, but, as has been observed to happen in other tumors, in the course of the first transplantations it underwent a marked change in its microscopical appearence, consisting in the transformation of the initial adeno-carcinomatous structure into a sarcomatous one made up exclusively of spindle shaped cells.

With the transformation of its microscopic picture, an increase of its ability to be transplanted was also observed. The number of positive results following the first inoculations varied from twenty to thirty percent, and reached one hundred percent, in which it is mantained up to the present.

BIBLIOGRAPHIA

ANDREWES, C. H., — 1936 — Evidence for the presence of virus in a non-filterable tar sarcoma of the fowl. Jour. Path. and Bact., **43**, 23-34.

LEWIN, C. — 1928 — Die Aetiologie der bösartigen Geschwülste. Julius Springer. Berlim.

REDAELLI, P. e DE GAETANI, G. — 1931 — Esperimenti e considerazioni intorno ad un sarcoma spontaneo del topo. Tumori, **5**, 128-144.

WOGLOM, W. H. — 1913 — Studies in Cancer and allied Subjects of experimental cancer. Columbia University Press, New York, **1**, Cap. IV, 58-128.

BASHFORD, MURRAY and HAALAND, in WOGLOM, loc. cit.

CLUNET, in WOGLOM, loc. cit.

EHRLICH and APOLANT, in WOGLOM, loc. cit.

LEWIN, in WOGLOM, loc. cit.

LIEPMANN, in WOGLOM, loc. cit.

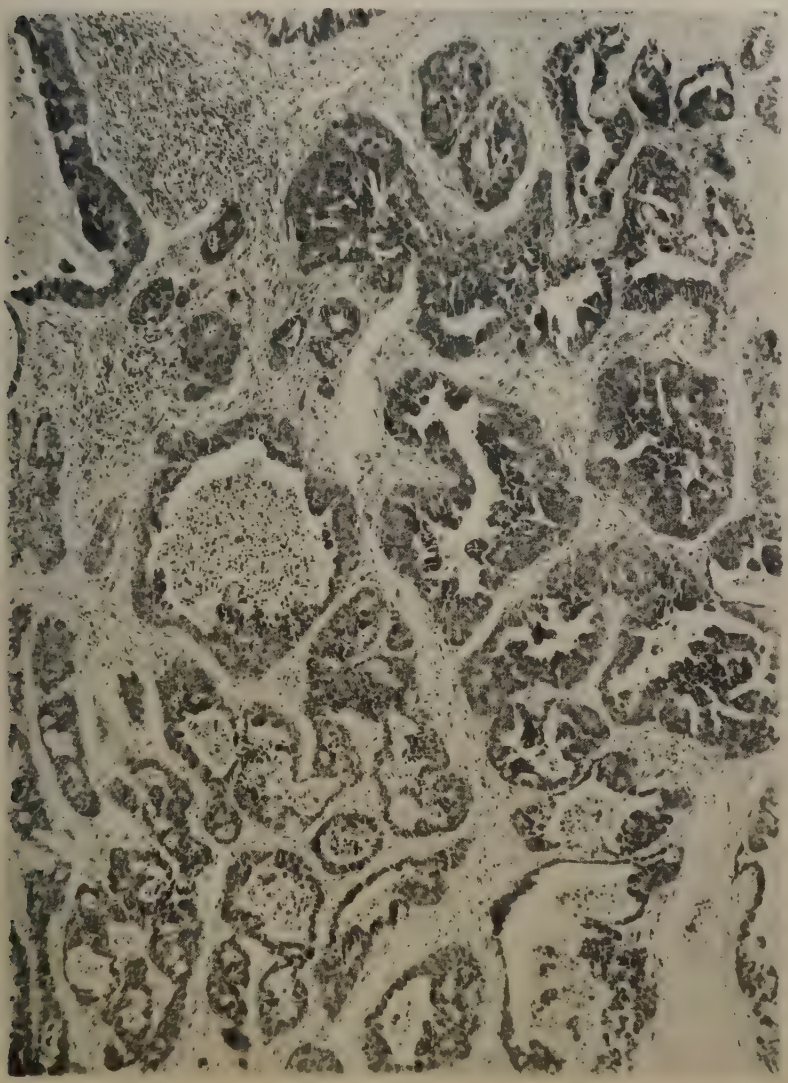
LOEB, in WOGLOM, loc. cit.

A — Adenocarcinoma resultante da primeira passagem.

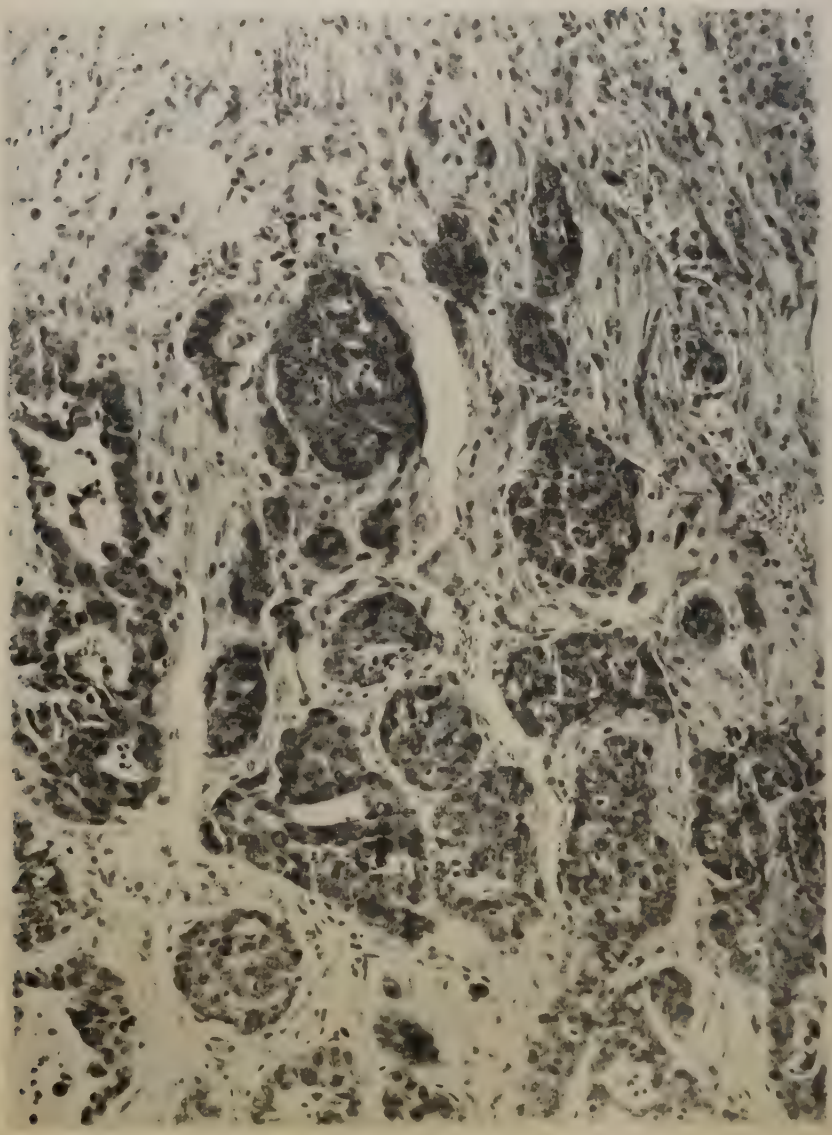
B — Adenocarcinoma resultante da segunda passagem.

A — Adenocarcinoma resultante da segunda passagem.

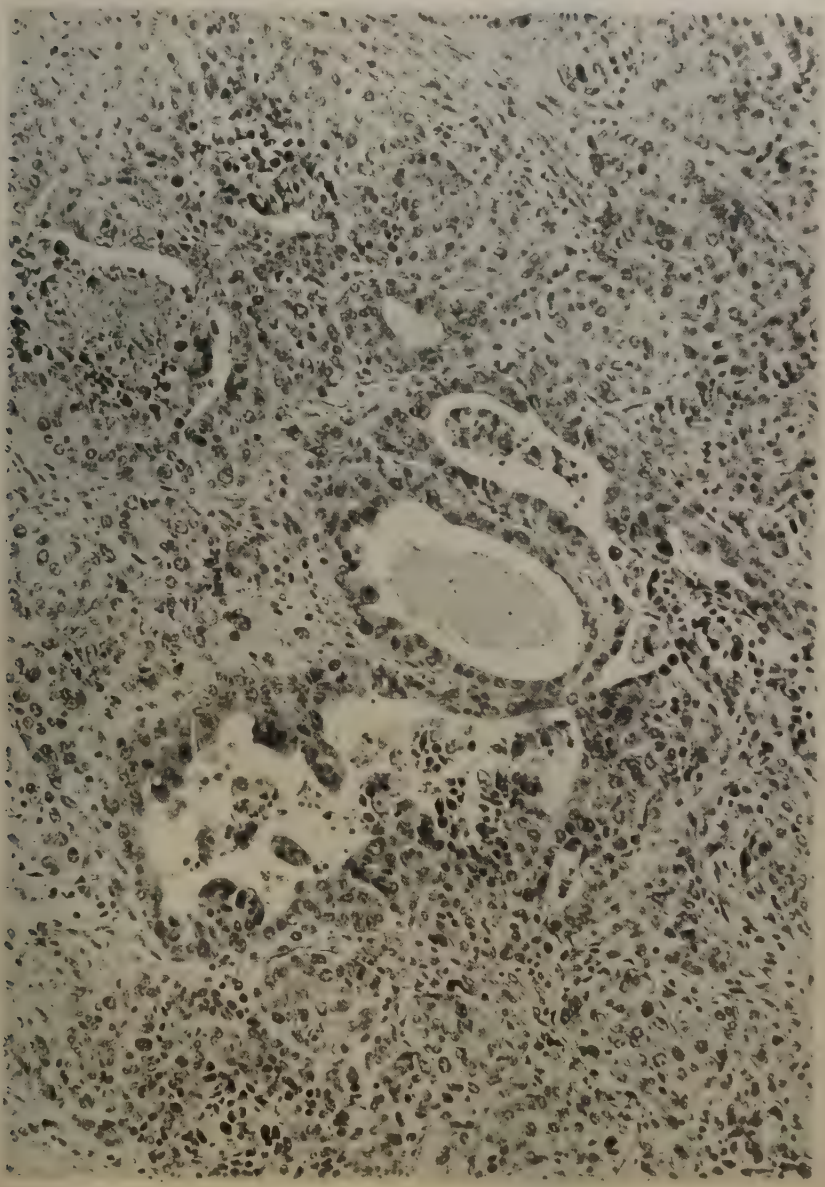
B — Adenocarcinoma resultante da terceira passagem.



Estructura microscopica do tumor original. Vê-se grande numero de acinos separados por estroma discreto, e uma estructura typicamente adenocarcinomatosa.



Aspecto microscopico de um tumor resultante da segunda passagem. Comquanto a estructura ainda seja de um adenocarcinoma, já se nota que as porções epitheliaes tendem a formar massas solidas.



Aspecto microscopico de um tumor resultante da quarta passagem. Ainda existe uma porção epithelial perfeitamente caracteristica. No estroma ha uma franca hyperplasia de elementos conjunctivos (?) que se continuam sem linha nitida de demarcação, com os elementos epitheliaes.

Aspecto microscopico encontrado depois da nona passagem. Apenas se vêm elementos conjunctivos com os caracteres de um fibrosarcoma typico.

Vol. 7 — Art. 11 Novembro de 1936

SOBRE SUBSTANCIAS VEGETAES QUE ESTIMULAM O ALONGAMENTO E A DIVISÃO DAS CELLULAS

POR

K. Silberschmidt e M. Kramer

Trabalho do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 21-23

Temos a communicar algumas experiencias sobre a reacção das cellulas de tecido parenchymatoso das plantas, provocada por substancias contidas no succo prensado das plantas.

Alongamentos e divisões de cellulas, attribuidas aos succos prensados de plantas, foram descriptos, pela primeira vez, por G. HABERLANDT (1). Um melhoramento da technica foi proposto por WEHNELT (11). Recentemente tambem JOST (4) occupou-se com o esclarecimento do mesmo problema.

O nosso interesse dirigiu-se especialmente para tres questões:

1) Quaes as condições externas, que têm influencia na intensidade da reacção?

2) Existe uma correlação entre a intensidade da reacção e a affinidade que liga a planta de «test» (a usada como reagente) com a planta que fornece o succo?

3) As galhas naturaes (causadas pelos insectos, fungos e bacterias) podem ser attribuidas á acção das mesmas substancias, que provocam a reacção descripta por WEHNELT?

São os seguintes os resultados até agora obtidos nas experiencias relativas a cada um desses assumptos:

I — CONDIÇÕES EXTERNAS

a) *Methodo das experiencias.*

Conforme as indicações de WEHNELT, usámos vagens de Phaseolus para verificar a efficacia dos differentes succos.

As vagens são cortadas em varios pedaços, conforme o numero das sementes que contêm. Cada um desses pedaços corresponde á camara de uma semente. Essa camara é aberta cuidadosamente em duas metades tão eguaes quanto possivel. Retirada a semente, colloca-se no interior de cada metade da camara uma gotta do succo em observação; a outra metade recebe uma gotta de agua ou de uma outra substancia, que serve como testemunha. Alguns dias depois, os pedaços de vagens — que são conservados em caixas de Petri com areia esterilisada no fundo — são observados macroscopicamente, avaliando-se a intensidade da reacção. Para exprimir os differentes

gráus dessa intensidade, usamos nas nossas tabellas differentes numeros de cruzes (+++,++,+−++,+,±,−).

Tanto mais forte é considerada a reacção, quanto mais geral ella se mostra.

De uma parte desses pedaços de vagem fizeram-se, depois, cortes histologicos, a mão livre, e nelles se observou, ao microscopio, o typo da reacção.

b) *Condições physicas.*

1. *Influencia da temperatura na intensidade da reacção.*

Wehnelt e Jost encontraram fortes variações da intensidade da reacção em differentes estações e em differentes annos. Wehnelt obteve resultados pouco satisfactorios no verão humido (1926). Jost encontrou as mesmas difficuldades de obter boas reacções, justamente no verão secco de 1935. Em São Paulo, tivémos a vantagem de ter vagens á nossa disposição durante todo o anno. Em geral, a sensibilidade da reacção foi bôa e maior no verão (Dezembro até Maio) do que no inverno. Não verificamos se as vagens cultivadas nas diversas estações do anno possuem gráus de sensibilidade differentes. Observamos, porém, que a temperatura, durante o contacto entre a gotta e a camara da vagem, exercia muita influencia na intensidade da reacção.

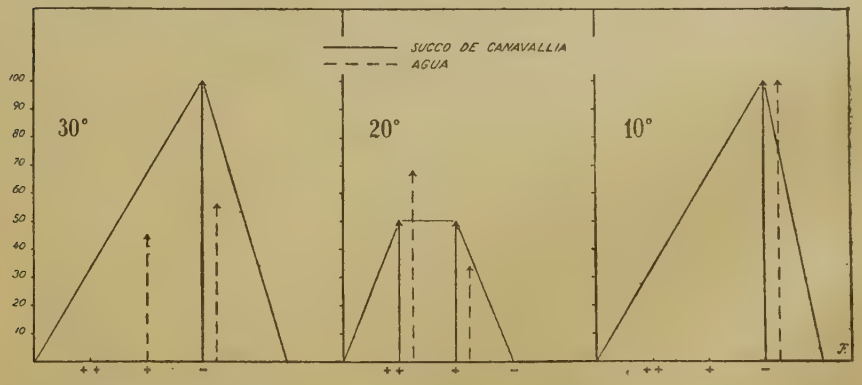


Fig. 1 — Influencia de tres differentes temperaturas sobre a intensidade da reacção com succo prensado de *Canavallia ensiformis* e com agua. Experiencia I.

Experiencia I.

Em 8-VII-36 foi preparado um succo prensado de 15 grs. de folhas de *Canavallia ensiformis; 21* metades de camaras de vagens

receberam uma gotta desse succo, emquanto as outras 21 metades foram, na qualidade de testemunhas, tratadas só com agua; as caixas de Petri com as camaras foram divididas em 3 series, e estas collocadas em estufas com temperaturas da resp. 30°, 20° e 10° C. Foram observadas as reacções nos dias 10 e 14 de Julho. Os resultados obtidos estão representados sob a forma de curvas (fig. 1).

Essa representação graphica mostra que a temperatura de 20° favorece o desenvolvimento da neoformação, que denominamos «callo».

2. *Influencia da humidade.*

Como Jost (ibid. pag. 737), tambem nós pensavamos que talvez a humidade do ar, propria do meio ambiente, pudesse estimular o crescimento das cellulas das vagens. Por essa razão procuramos verificar as differenças que se manifestam entre as vagens, quando conservadas sobre areia secca, ou humida; nunca entretanto, se originaram elevações como nos pedaços que tinham recebido uma gotta de agua. A differença entre as camaras se limitava ao facto de mudar-se mais rapidamente para o branco a côr dos pedaços conservados num ambiente secco, emquanto as testemunhas conservavam a côr verde normal.

3. *Influencia da concentração.*

Jost (ibid. pag. 737) accentuou a grande significação que tem a concentração do succo, quanto ao aspecto da reacção da vagem. Mostrou que, com diminuição da concentração do succo, o numero total das divisões cellulares se reduz.

Mas elle considerava sómente 3 differentes concentrações: succo normal, succo a 1/10 e s. a 1/100. Não tendo elle podido constatar differença notavel entre a reacção de agua e a de succo a 1/100, ficaram somente duas concentrações para serem examinadas.

Julgamos por isso conveniente experimentar novamente a influencia da concentração, uma vez que Jost tomara em consideração somente as divisões das cellulas, desdenhando a influencia que tem a concentração tambem sobre o alongamento dellas. Por essa razão, pensamos que nesse ponto, a observação relatada por L. Jost precisa de um complemento.

Vamos dar primeiramente os resultados das experiencias feitas com uma serie de diluições, comprehendida entre o succo concentrado e diluido a 1/20.

a) OBSERVAÇÕES MACROSCOPICAS

Experiencia II.

30 grs. de folhas de *Canavallia ensiformis* foram trituradas no almofariz, sem addição de agua, e o succo foi prensado atravez

de um pedaço de «etamine»; esse succo foi considerado como concentração 1. Dois c. c. deste succo foram conservados, e com o resto prepararam-se as concentrações de 1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, 1/7, 1/8, 1/9, 1/10 e 1/20.

Antes haviam sido preparados pedaços de agar, bem limpos, a 3 %, em forma de parallelepipedos, das dimensões de uma caixa de phosphoros commum. Desse agar foram então cortados, por meio de um furador de rolhas, cylindros de cerca de 5 cms. de comprimento, e de 0,5 cm. de diametro; taes cylindros eram, pela parte superior, suspensos, por meio de agulhas, de modo que somente a sua parte inferior ficasse mergulhada ($\pm$ 0,2 cm) em succo a $^1/_2$, para verificar a velocidade da diffusão do succo no agar, verificando-se, sobre vagens, a acção de fatias (discos) cortadas em differentes alturas desses cylindros.

Foram effectuadas as seguintes modalidades de ensaios:

I. 11 camaras de vagens foram partidas ao meio conforme acima se descreveu. Cada uma das metades dessas camaras, de um lado somente, recebeu uma gotta de succo, respectivamente de cada uma das 11 concentrações preparadas; as outras metades correspondentes receberam, como testemunhas, gottas de agua distillada. Essa serie foi repetida 4 vezes.

II. Num outro ensaio o effeito das 11 concentrações do succo foi comparado com a acção dos discos de agar. Estes foram obtidos por cortes transversaes nas differentes alturas de um cylindro que estivera mergulhado pela sua parte inferior no succo a $^1/_2$ de *Canavallia*. A camara da vagem, metade da qual fôra tratada com o succo concentrado, recebeu na outra metade o disco da parte mais inferior do cylindro. Nas duas metades da camara seguinte foi disposto, de um lado o succo diluido pela metade, e do outro a seguinte fatia (na ordem ascendente) do cylindro de agar, e assim por diante. O cylindro havia ficado mergulhado 3h.16′ no succo, e os discos tinham 1 mm de altura cada um.

III. Em 3 outros ensaios usaram-se tambem fatias de cylindros de agar mergulhados em succo de *Canavallia* a $^1/_2$ e, como testemunhas, fatias de eguaes cylindros que haviam sido mergulhados durante o mesmo tempo, em agua distillada.

Resultam assim 8 series de experiencias iniciadas em 8 de Junho e observadas a 12 e a 15 de Junho do corrente anno.

Para mostrar a maneira pela qual temos registrado os resultados, vamos dar aqui as notas completas de uma serie de experiencias do grupo I, que julgamos typica.

Os resultados das outras series daremos sob a forma de tabellas mais resumidas.

TABELLA I

Comparação do effeito da agua e de differentes concentrações de succo de *Canavallia,* sobre as vagens.

Serie I, 3.ª

Succo de *Canavallia*			H_2O	
Conc.	12. VI	15. VI	12. VI	15. VI
1	N	N	—	±
1/2	N	—	±	±
1/3	—	—	—	—
1/4	N	—	—	+
1/5	—	—	+	+
1/6	+ — + +	+ +	—	±
1/7	+	+	—	—
1/8	N	N	—	—
1/9	+ +	+ — + +	—	—
1/10	+ +	+ +	±	—
1/20	+ +	+ +	+	+

Em fortes concentrações, o succo deixa, em muitos casos, de provocar reacções macroscopicas; sua acção apenas se manifesta sob a forma de necroses (= N da tabella). Concentrações mais fracas, porém, dão reacções mais fortes.

Apresentamos, agora, os resultados totaes dessas experiencias, dando (em numeros absolutos e em porcentagem) a frequencia das differentes intensidades de reacção, observadas sob a influencia de differentes concentrações de succo de *Canavallia.*

Para simplificar os resultados obtidos com as 11 differentes concentrações e com os 12 discos de agar, organisamos 4 grupos:

A: concentração 1 até 1/3
B: » 1/4 » 1/6
C: » 1/7 » 1/9
D: » 1/10 e 1/20

Da mesma maneira apresentaremos os resultados das testemunhas tratadas com agua, ao passo que, dos 15 discos cortados dos cylindros mergulhados em agua ou em succo, formamos apenas 3 grupos, de 5 cada um.

TABELLA II

Comparação entre o effeito da agua e de differentes concentrações de succo de *Canavallia*.

Grupo	*Canavallia*					H_2O				
	Intensidade da reacção	Obs. de 12 - VI - 36		Obs. de 15 - VI - 36		Intensidade da reacção	Obs. de 12 - VI - 36		Obs. de 15 - VI - 36	
		N. absoluto	Porcentagem	N. absoluto	Porcentagem		N. absoluto	Porcentagem	N. absoluto	Porcentagem
A) Concentrações 1 - 1/3	++	—	—	2	20	++	—	—	—	—
	+−++	1	8,34	—	—	+−++	—	—	—	—
	+	3	25	1	10	+	5	41,6	4	44,4
	±	1	8,34	1	10	±	3	25	2	22,2
	— ou ?	2	16,7	3	30	— ou ?	4	33,3	3	33,3
	N	5	41,7	3	30	N	—	—	—	—
B) Concentrações 1/4 - 1/6	++	1	8,34	2	16,7	++	—	—	—	—
	+−++	1	8,34	1	8,34	+−++	—	—	—	—
	+	4	33,3	2	16,7	+	3	25	5	41,6
	±	1	8,34	3	25	±	1	8,34	2	16,7
	— ou ?	3	25,0	3	25	— ou ?	8	66,6	5	41,6
	N	2	16,7	1	8,35	N	—	—	—	—
C) Concentrações 1/7 - 1/9	++	3	25	—		++	—	—	—	—
	+−++	1	8,34	3	27,2	+−++	—	—	—	—
	+	3	25	4	36,4	+	3	25	1	10
	±	—	—	—	—	±	2	16,7	3	30
	— ou ?	4	33,3	3	27,2	— ou ?	7	58,4	6	60
	N	1	8,34	1	9,1	N	—	—	—	—
D) Concentrações 1/10 e 1/20	++	3	42,8	2	33	++	—	—	—	
	+−++	1	14,3	—	—	+−++	1	14,3	—	
	+	1	14,3	2	33	+	3	42.7	3	50
	±	—	—	2	33	±	1	14,3	—	
	— ou ?	2	28,6	—	—	— ou ?	2	28,6	3	50
	N	—	—	—	—	N	—	—	—	—

A porcentagem das camaras, que mostraram em 12-VI uma reacção ao menos normal (+), é no grupo A: 35,34 (test. 41,6), B: 49,98 (25), C: 58,34 (25) e D: 71,4 (57). Com a diminuição da concentração, a intensidade e a frequencia das reacções augmentam — dentro dos limites aqui estabelecidos. As camaras tratadas com agua mostram somente fluctuações irregulares.

Este resultado se verifica tambem nas experiencias realizadas com os discos de agar, das quaes damos os resultados na tabella III.

TABELLA III

Comparação entre os discos de agar mergulhados em succo de *Canavallia* e em agua.

Grupo	*Canavallia*					H_2O				
	Intensidade	Obs. 12-VI		Obs. 15-VI		Intensidade	Obs. 12-VI		Obs. 15-VI	
		N. absoluto	Percentagem	N. absoluto	Percentagem		N. absoluto	Percentagem	N. absoluto	Percentagem
A) Os 5 pedaços inferiores	+ +	1	5	—	—	+ +	—	—	—	—
	+ − + +	2	10	1	5,2	+ − + +	—	—	—	—
	+	1	5	1	5,2	+	2	13,3	4	26,6
	±	4	20	4	21,	±	3	20	3	20
	— ou?	11	55	12	63	— ou?	10	66,7	8	53,9
	N	1	5	1	5,2	N				
B) Discos 6 - 10	+ +	—	—	3	15	+ +	—	—		
	+ − + +	2	10	—	—	+ − + +	—	—	2	13,3
	+	2	10	3	15	+	3	20	4	26,6
	±	5	25	3	15	±	3	20	3	20
	— ou?	11	55	11	55	— ou?	9	60	6	40
	N	—	—	—	—	N	—	—	—	—
C) Discos 11 - 15	+ +	1	7,15	3	20	+ +	—	—	—	—
	+ − + +	1	7,15			+ − + +	—	—	—	—
	+	4	28,6	6	40	+	3	27,2	7	58,4
	±	3	21,4	1	6,7	±	5	45,4	2	16,7
	— ou?	5	35,8	5	33,3	— ou?	3	27,2	3	25
	N	—	—	—	—	N	—	—	—	—

As experiencias com cylindros de agar permittiram observar bem a velocidade de diffusão do succo. Nessas experiencias os cylindros ficaram mergulhados durante 3 horas. Ao fim desse tempo o cylindro tingiu-se de um verde escuro, até 1,5 cms. acima da superficie do liquido; de um verde claro, no cm. superior; dahi para cima, o resto do cylindro permaneceu sem colloração especial. Apesar da concenção do succo difundido no agar ser mais fraca do que o succo original, tambem aqui os discos da parte inferior dos cylindros provocaram reacções menos pronunciadas do que as provocadas pelos discos das partes superiores.

Para provar que esses resultados não são casuaes, acrescentamos uma representação graphica dos resultados obtidos em ensaios realisados em 20-V.

Experiencia III

Em 20-V-36 foi preparado um succo de 5 grs. de folhas novas de *Phaseolus vulgaris*, da maneira usual. (As folhas cortadas foram trituradas no almofariz; addicionaram-se depois 5 cc. de agua distilada, e o succo foi filtrado atravez de papel de filtro).

Cylindros de agar, suspensos por meio de agulhas, foram em sua parte inferior mergulhados no succo de feijão, sendo outros do mesmo modo immersos em agua distillada. Os cylindros ficaram suspensos durante 5 horas e foram depois cortados em fatias de 1 mm. de altura. Esses discos foram collocados em cima de camaras de vagens previamente preparadas. Uma das metades da camara 1 recebeu o disco da parte inferior do cylindro mergulhado em succo de feijão e a outra o correspondente da testemunha, em agua; a camara 2 foi da mesma maneira tratada com os discos subsequentes etc. O effeito macroscopico das substancias diffundidas nos cylindros foi controllado (22 e 24-V).

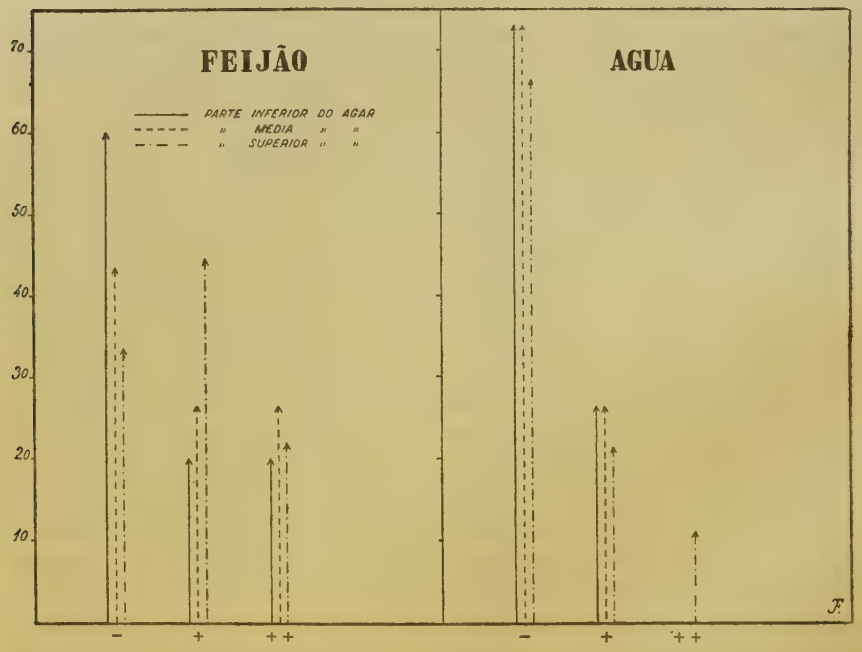


Fig. 2 — O effeito dos discos de differentes alturas de cylindros de agar, sobre a intensidade da reacção. Experiencia I.

No quadro que damos, (Fig. 2) dividimos os 15 discos cortados dos cylindros, em 3 grupos de 5 cada um, conforme a situação delles

no cylindro. Verifica-se assim a differença entre os effeitos das partes inferior, media e superior do cylindro. Por economia de espaço, somente apresentamos os resultados da observação de 24-V. (fig. 2). A porcentagem dos discos que não provocaram uma reacção foi muito maior quanto á parte inferior que quanto á parte media e á superior dos cylindros. Ao contrario, os discos tomados da parte media e superior dos cylindros causaram, na maioria dos casos, uma reacção perceptivel. Os 3 grupos correspondentes, de discos de cylindros de agar mergulhados em agua, apresentam somente reacções fracas mas sem differenças acentuadas entre os tres grupos.

Sobre o mesmo assumpto, fizémos outra serie de experiencias (2 a 8-VII).

Experiencia IV

Foi usado succo de *Canavallia ensiformis* (20 grs. folhas + 20 cc. H_2O). Esse succo foi, sem previa filtração, centrifugado durante 15 Min. a 1.000 rotações; 6 cylindros de agar foram mergulhados nelle, e 6 em agua. Para as experiencias sobre as vagens, usaram-se fatias de 1 mm. cortadas dos 6 cylindros de agar postos em contacto com o succo, servindo como testemunhas as correspondentes de 4 cylindros de agar tratados com agua distillada. A reacção dos discos do 5.º cylindro tratado com succo de *Canavallia* foi comparada com o effeito de gottas de agua distillada, e a reacção dos discos do 6.º e ultimo cylindro, com o effeito de gottas do proprio succo de *Canavallia*.

O resultado dessas experiencias concordou com as conclusões dos outros ensaios; em geral, porém, a reacção manifestou-se mais fraca, devido a ser a estação a mais fria do anno.

b) OBSERVAÇÕES MICROSCOPICAS

Jost (ibid. pag. 736) baseou a sua opinião sobre a acção dos differentes succos, numerando as paredes de cellulas recentemente formadas e observadas ao microscopio em cortes transversaes coloridos pelo Congorot. Confirmando o que antes já constatara, verificou então que existe uma correlação entre a concentração do succo e o nivel em que se realisa a reacção: a epiderme, por exemplo, quasi não apresenta divisões cellulares sob a influencia de fortes concentrações dos succos, ao passo que, nas mesmas condições, a terceira camada é muito estimulada. Ao contrario, a acção de um succo diluido a 1:100, é mais intensa na divisão das cellulas da epiderme do que na das camadas mais baixas.

Tambem em nossas experiencias essa lei se confirmou. Mas nós em geral não empregamos o methodo da numeração das paredes

das cellulas divididas, porque elle somente esclarece um dos componentes da reacção. Faltar-nos-iam, nos resultados assim conseguidos, indicações mais precisas sobre o alongamento das cellulas, sobre as differenças entre a margem e o centro da elevação, sobre as alterações na composição das paredes, e outros esclarecimentos mais. Por essa razão, pensamos ser de maior valor a differenciação entre os typos da reacção, apezar de nem sempre poderem elles ser claramente separados.

Procuramos primeiramente dar por meio das microphotographias, uma ideia desses differentes typos da reacção.

I. A primeira figura na estampa 22 (A, Serie *agua* — Can. Exp. de 6-12-35) mostra um córte transversal atravez de uma elevação causada por uma gotta de agua collocada sobre o centro de uma camara de vagem. Podemos distinguir nesse quadro 4 differentes tecidos: 1) a epiderme, que apresenta algumas efflorescencias em forma de pêras, ou esphericas; 2) o parenchyma superficial (mais ou menos 5 camadas), cujas cellulas somente em poucos lugares são dispostas em series verticaes; 3) os vasos superficiaes; e 4) o parenchyma profundo, que se compõe de cellulas aproximadamente redondas e irregularmente formadas e distribuidas.

II. A segunda figura da estampa 21 já mostra uma alteração essencial desses tecidos (B, Exp. de 20-5-36; effeito de um disco de agar (ped. N.º 10) mergulhado em succo de feijão).

As efflorescencias da epiderme são aqui minimas; embaixo da epiderme, porém, podemos observar sequencias lineares de cellulas do tecido parenchymatoso superficial, constituidas por cellulas néoformadas sob a influencia das substancias diffundidas de cima. A intensidade da neoformação é, neste caso, irregular, de maneira que se distinguem, mesmo macroscopicamente, elevações separadas. O vaso está curvado para baixo; as cellulas do parenchyma profundo não são alteradas.

Uma variação deste typo está representada em uma outra estampa (estampa 22, B, *Carica* - H_2O).

Aqui, no campo central da reacção, isto é, no circulo coberto com os restos da pasta, a reacção é mais uniforme. Observam-se tambem a disposição em series lineares, das cellulas do parenchyma superficial, descriptas acima. Além disso, apresenta-se na margem da reacção uma proliferação forte e mais irregular, das cellulas superficiaes.

III. Um typo bem differente da reacção é representado pela figura C da estampa 21 (Exp. de 20-V-36, agar em succo de feijão, ped. 2) e, melhor ainda, pela figura C da estampa 22 *(Can* — Mata-

matto). A epiderme, o parenchyma superficial e o vaso superficial mostram aqui, com relação ao numero e ao tamanho das cellulas, leves differenças em comparação com a estructura normal das vagens. Somente a largura das paredes das cellulas é augmentada e em muitas cellulas encontram-se abundantes depositos escuros.

A grande differença entre este e os outros typos de reacção basea-se, entretanto, nas alterações das cellulas das camadas profundas. Neste caso, as cellulas são muito maiores, são alongadas (na direcção perpendicular á da epiderme) e tambem muitas vezes dispostas em series (vide Est. 22 C). As paredes destas cellulas tambem são muito fortes.

Nem sempre cada um desses typos microscopicos coincide com o aspecto macroscopico das reacções correspondentes. Na maioria dos casos, todavia, cada typo microscopico pode ser attribuido a uma certa intensidade macroscopica da reacção.

I. O typo microscopico I corresponde, em geral, a uma leve elevação do campo de reacção, que termina justamente na margem da gotta. Sob a influencia da agua, a elevação só se distingue por uma côr branca.

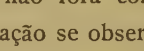
II. Ao typo II, corresponde a reacção que se manifesta:

a) por elevações separadas

ou b) por elevações massiças, que são deprimidas no centro (forma)

ou c) por fracas elevações, que são cercadas de anneis de um tecido claro e esponjoso.

Nos 3 casos a superficie, ao redor do campo onde se encontrava a gotta, não é alterada.

III. Elevação muitas vezes fraca, mas passando pouco a pouco para o campo que não fôra coberto pela gotta. Num córte transversal, este typo da elevação se observa da seguinte forma: (). Muitas vezes se encontra ao redor desta elevação um annel, que se distingue do annel do typo II C, pelo facto de ser o annel (do typo III) formado um pouco além do campo coberto pela gotta e ser composto de tecido normal.

Nem sempre este ultimo typo é macroscopicamente distinguivel. Quando a elevação é bem fraca, registramol-a como (—) para esta reacção; em outros casos, em que se distinguiu bem a extensão geral da reacção, a sua intensidade recebeu maior valor (++).

Assim como procuramos, em nossas tabellas II e III, attribuir a cada concentração do succo um determinado aspecto macroscopico da reacção, tambem tentamos agora estabelecer as relações entre as differentes concentrações dos succos e os typos microscopicos da reacção. Aqui as annotações usadas têm significação especial.

(+++) e (++) indicam differentes intensidades da reacção geral e profunda (typo III micr.).

(+) reacc. forte, mas superficial (typo II).

(±) reacc. leve, superf. (typo I).

Da serie da experiencia III, de 20-V, cujos resultados macroscopicos são representados na fig. 2, cortamos alguns pedaços e verificamos o typo microscopico de reacção. Consideramos todos os pedaços cortados como fazendo parte de dois grupos: A) camaras de vagens que receberam discos da parte inferior dos cylindros (discos 1-5) — e B) camaras que receberam discos da parte superior (de 6 em diante).

TABELLA IV

Reacções microscopicas causadas, na experiencia de 20-V, pelas substancias contidas nos discos de

	agar merg. em agua			agar merg. em s. de feijão		
	Marcas	Numeros absolutos	%	Marcas	Numeros absolutos	%
A - Parte inferior do cylindro	+++			+++	1	12,5
	++			++	5	62,5
	+	4	57	+	2	25,0
	±	3	43	±		
	—			—		
B - Parte superior do cylindro	+++			+++		
	++			++		
	+	4	66,7	+	5	83,4
	±	2	33,3	±	1	16,6

Da tabella IV podemos verificar que, das camaras de vagens tratadas com discos da parte inferior dos cylindros de agar, 85,8 % apresentavam reacções profundas (do typo III), emquanto das camaras tratadas com os discos da parte superior, 83,4 % se distinguiram por serem as reacções superficiaes (typo II). E' verdade que este calculo é incompleto, pois seria preciso cortar todos os pedaços das duas series, visto que, escolhendo-se somente alguns pedaços, existe o perigo de tomar sempre pedaços de um só typo. Apezar disso,

o resultado permitte concluir que as concentrações fortes muitas vezes provocam o typo III; as concentrações fracas, o typo II da reacção.

O mesmo resultado se pode tirar das observações microscopicas da experiencia de 12-16 Junho (vide Tab. II e III).

TABELLA V-A

Reacções microscopicas causadas, na experiencia de 12-16 Junho, pelas substancias contidas:

	nos discos de agar, merg. em succo de *Canavallia*			nos discos de agar, merg. em agua		
	Marcas	Numero absoluto	%	Marcas	Numero absoluto	%
A - discos da parte infer. dos cylindros (1-5)	++	4	80	++		
	+	1	20	+		
	±			±	2	66,6
	—			—	1	33,3
B - discos da parte super. dos cylindros (6-15)	++	2		++	1	33,3
	+	3		+	1	33,3
	±		40	±	1	33,3
	—		60	—		

TABELLA V-B

Reacções microscopicas causadas pelas differentes concentrações do succo de *Canavallia,* na experiencia de 12-16 Junho.

	Canavallia			H_2O		
	Marcas	Numero Absoluto	Percentagem	Marcas	Numero Absoluto	Percentagem
A.) Concentrações fortes 1-1/5	+++	5	83,5	+++		
	++	1	16.5	++		
	+			+		
	±			±		
	—			—	4	(100)
B.) Concentrações fracas 1/6-1/20	+++			+++		
	++	1	25	++		
	+	3	75	+		
	±			±		
	—			—	1	(100)

Resumindo os resultados destes ensaios, pode-se constatar:

1) Elevações, causadas pelo alongamento e divisão das cellulas, formam-se nas camaras de vagens somente em consequencia de substancias depositadas na superficie.

2) A temperatura tem uma grande influencia na occorrencia e na intensidade da reacção.

3) As substancias podem ser levadas ao contacto da planta sob a forma de uma gotta ou, tambem, suspensas no agar.

4) Distinguem-se differentes typos macro e microscopicos da reacção.

5) Fracas concentrações geralmente provocam typos de reacção que se localisam de preferencia nas camadas superficiaes; fortes concentrações, quasi não estimulam as camadas superficiaes, são comtudo activas sobre as profundas.

c) *Condições chimicas*

Desde os trabalhos de WEHNELT e de JOST, sabemos que differentes substancias chimicas puras podem provocar a reacção. JOST obteve (ibid. pag. 742) resultados positivos com assucares (Laevulose 2-15%), CH_3COOH (1/1000 e 1/10000), *Acido citrico* (mesma concentração), NaCl (1 % e 1 $^0/_{00}$), *Heteroauxina* (1 $^0/_{00}$).

Os autores não deram porém uma descripção do typo da reacção provocada por essas substancias. Assim, não se pode dizer se essas substancias provocam o mesmo typo de reacção que a dos succos prensados.

Surge agora a questão: a reacção é causada por substancias differentes, existentes no succo das plantas, ou é sempre determinada por uma mesma substancia?

Neste ultimo caso, mereceriam attenção as relações que possam existir entre essa substancia e os «hormonios».

HABERLANDT, que primeiro observou reacções dessa natureza, attribuiu-as ao effeito de «hormonios» (Wundhormone). Desde então, o conhecimento dos «hormonios de crescimento» tem feito grandes progressos (WENT, (12) LAIBACH e FISCHNICH (7) e outros) e tem collocado esse grupo de substancias quasi no ponto de convergencia do interesse biologico. Agora é preciso verificar se os «hormonios de feridas» (conforme acceita HABERLANDT) existem, e quaes as relações entre elles e os «hormonios de crescimento».

JOST (ibid. 741) já mostrou que a auxina é efficaz sobre vagens, mas que a reacção pode ser provocada tambem em condições que não permittem a diffusão da auxina nas vagens. Assim, restam somente duas possibilidades.

1) a reacção é causada por «hormonios» que não são identicos aos «hormonios do crescimento», mas talvez tenham qualquer relação com elles.

2) a reacção é causada por outras substancias, que podem ser de uma natureza chimica uniforme ou complexa. Nos ultimos annos, abstrahindo os «hormonios de crescimento», foram encontradas muitas substancias que estimulam os differentes estados do crescimento das plantas, como a formação das raizes, a epinastia das folhas e o crescimento do diametro das hastes. ZIMMERMANN P. W. *and* HITCHCOCK (3, 13 14), KRASSINSKY N. S., e ANDREJEWA E. D. (6) occuparam-se especialmente com o effeito de ethylenio, propylenio, monoxydo de carbono, acetylenio, e de 11 outras substancias organicas.

As nossas experiencias sobre a natureza chimica das substancias activas do succo das plantas estão ainda em inicio. Até hoje sómente examinamos duas questões:

a) em que orgãos da planta se encontra a maior quantidade das substancias estimulantes?

b) que solvente dá os mais fortes extractos?

a) O effeito do succo prensado dos differentes orgãos de uma planta.

Experiencia IV

Plantas jovens de *Phaseolus vulgaris* foram cultivadas desde o dia 17-VI em serragem; a 22-VI, 22 plantinhas foram lavadas e separadas em: raizes, folhas, hastes e cotyledones. Havia, para cada grupo, 14 grs. de peso fresco dos orgãos. Destes, foram preparadas pastas com addição de 14 cc. de agua destillada; filtração com auxilio de uma trompa de vacuo e com um funil segundo WILLSTÄEDTER. Foram organisadas 4 series de 10 caixas de Petri e cada caixa recebeu 3 pares de metades de camaras de vagens. Nessas 4 series foram comparados os effeitos dos seguintes succos: serie 1: raizes — folhas; s. 2: cotyledones — folhas; s. 3: hastes — folhas, e s. 4: hastes — raizes. As caixas foram observadas nos dias 25 e 27-VI. Os resultados de 27-VI (porcentagem dos differentes estados de intensidade em relação ao numero total das camaras) acham-se representados graphicamente na figura 3.

Por esses graphicos podemos verificar que todos os orgãos examinados são capazes de provocar a reacção nas vagens. Em relação ao gráu de intensidade, porém, mostraram-se differenças, que podem ser do seguinte modo caracterizadas:

Folhas> cotyledones> hastes> raizes.

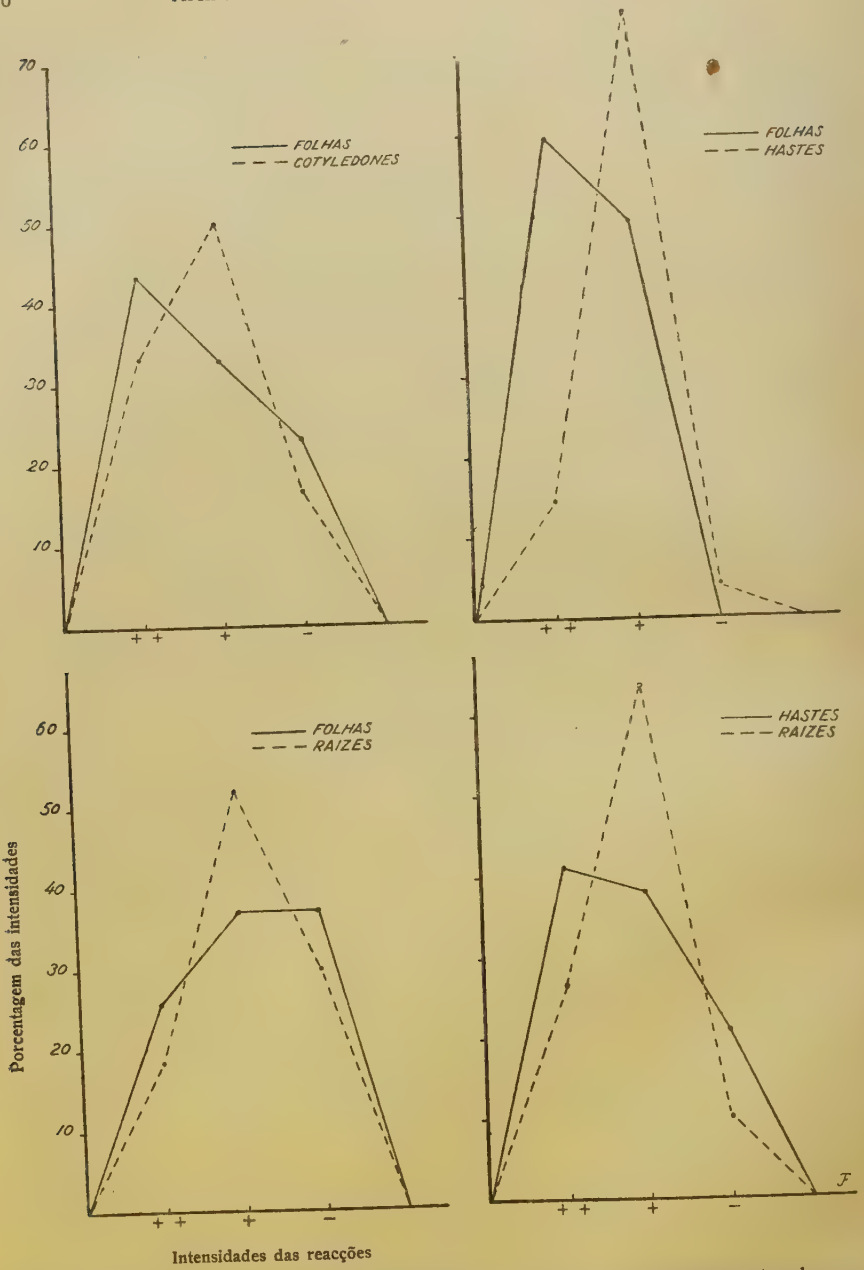


Fig. 3 — Representação graphica da distribuição das substancias estimulantes do crescimento das cellulas, em folhas, cotyledones, hastes e raizes de *Phaseolus vulgaris*. Experiencia IV.

Das vagens tratadas com o succo de cotyledones e de folhas, foram feitos 12 córtes, e o exame microscopico revelou que o succo de cotyledones tinha provocado reacções profundas em 33,4 % dos casos totaes, e o succo das folhas, em 83,4 % dos casos.

Experiencia V

A serie de experiencias precedente ficou completada por esses ensaios de 15-VII-36.

De uma maneira uniforme, 15 grs. de folhas e petalas de *Canavallia ensiformis* e de fructas e sementes de *Phaseolus vulgaris* foram trituradas no almofariz, completadas as pastas com 15 cc. de agua distillada, prensadas atravez de etamine e centrifugadas durante 20 min., a 1.000 rotações p/m.

Simultaneamente foi collectado um pouco de pollen de *Canavallia ensiformis,* distribuido em 1 cc. de agua distillada e usado assim para as experiencias.

As experiencias mostraram que nem os succos de petalas, nem os das sementes, nem os de pollen deram reacções, ao passo que o succo prensado das folhas e das fructas estimulou, da maneira usual, a formação das elevações.

Parece, pois, que as substancias contidas nos orgãos reproductivos da planta não são tão activas como as dos orgãos vegetativos.

b) O effeito dos differentes solventes.

1) *Experiencia VI*

Vinte hastes de plantas novas (20,5 grs.) de *Phaseolus* da var. allemã branca foram em 29-VI cortadas, lavadas duas vezes (uma vez com 40, uma vez com 20 cc.) em agua fria *[extracto de lavagem* (1) e *Extracto em agua fria* (2)] aquecidas com 20 cc. agua distillada em banho-maria durante 20′ á 50° *[extracto aquoso quente* (3)], fervidas com agua (20 cc.; 20′) *[extracto aquoso fervido* (4)], e depois com alcool de 96° (20 cc.; 20′) e com ether sulfurico (20′; 20 cc.); os dois ultimos extractos foram evaporados até deixarem residuo secco e diluidos novamente com 20 cc. de agua distillada; a estes extractos demos o nome de *extracto alcoolico quente* (5) e *extracto ethereo quente* (6). Foram preparadas 6 series, cada uma com 8 placas de Petri e cada placa com 3 pares de metades de camaras.

Nestas 6 series foi comparado o effeito de

1) Ext. *agua fria* — ext. *aquoso fervido*
2) » » » — ext. *aquoso quente*

3) Ext. *agua fria* — ext. *de lavagem*
4) » » » — ext. *alcoolico quente*
5) » » » — ext. *ethereo quente*
6) » *aquoso fervido* — ext. *alcoolico quente.*

Foram observados os resultados em 3-VII e 6-VII. Os succos, em geral, deram resultados muito fracos, mas o succo 4 (extracto aquatico fervido) foi muito mais efficaz que os differentes extractos aquosos frios e o extracto aquoso quente (1, 2 e 3); o extracto etherico revelou-se o mais fraco, e, sem embargo, o extracto alcoolico não se distinguiu muito do extracto 4.

Pode-se objectar contra essas experiencias o ter sido nellas usado o mesmo material que havia sido tratado pelos differentes solventes, de maneira que, no fim, elle estaria já desprovido das substancias activas. Para esclarecer essa objecção, foi feita uma serie das experiencias, na qual 3 grupos, compostos das mesmas quantidades das folhas, foram submettidos á extracção com differentes solventes.

2) *Experiencia VII*

Foram pesadas 4 porções (de 5 grs.) de folhas de *Canavallia ensiformis* no dia 7 de Julho.

a) da primeira porção foi feito, com addicção de 5 cc. de agua distillada, um succo prensado normal.

b) a segunda porção foi lavada — depois de cortadas as folhas — com 5 cc. de agua distillada, depois levada ao banho-maria para ser extrahida durante meia hora, com 5 cc. de agua distillada, por meio do apparelho de microextracção de KLEIN u. TAUBÖCK; dahi resultou o *extracto aquoso quente.*

c) a terceira porção foi lavada com 5 cc. de alcool de 96 % e extrahida, da mesma maneira, $^1/_2$ h. com 5 cc. do mesmo solvente. Evaporado até deixar residuo secco e dissolvido em 5 cc. de agua, este succo forneceu o *extr. alcoolico quente.*

d) a quarta prova foi lavada com ether sulfurico e extrahida com o mesmo solvente. Foram usados 5 cc.; a extracção durou $^1/_2$ hora e o residuo do extracto evaporado foi dissolvido em 5 cc. de agua e se denominou *extracto etherico quente.*

Foram preparadas 4 series de experiencias, cada serie com 7 caixas de Petri. Em cada caixa dispuzeram-se 3 pares de metades de camaras de vagens.

Nas differentes series foram comparados os extractos seguintes:

1) Extracto aquoso quente — Extracto aquoso frio (de lavagem)

2) Succo prensado — Ext. aqu. quente
3) Succo prensado — Ext. alcoolico quente
4) Succo prensado — Ext. ethereo quente.

Foram examinadas as series nos dias 12, 13 e 17 de Julho. As observações do dia 13 de Julho são as da Tabella VI. Os numeros da tabella representam a porcentagem dos 3 estados principaes da intensidade quanto ao numero total das camaras de cada serie.

TABELLA VI

	mais do que +	+	menos do que +	mais do que +	+	menos do que +	
Serie 1 Ext. aqu. quente	47,6	19,0	33,3	19,0	43,0	38,0	Serie 1 Ext. aquoso frio
Serie 2 Succo prensado	19,10	47,7	33,35	14,32	23,8	61,95	Serie 2 Ext. aqu. quente
Serie 3 Succo prensado	28,6	28,6	42,84	4,9	14,3	80,8	Serie 3 Ext. alcool quente
Serie 4 Succo prensado	5,55	50,0	44,5	—	11,0	89,0	Serie 4 Ext. ether quente

Os resultados mostram as fluctuações do effeito, que o mesmo succo provoca em differentes series. Já WEHNELT e JOST observaram differenças na sensibilidade de differentes camaras e propuzeram, por essa razão, que fosse comparada a reacção de cada metade de uma camara com a reacção da outra metade. Apezar disso acreditamos poder aproveitar ainda os numeros estatisticos, naturalmente dentro de certos limites.

Em nossa tabella, não consideramos de grande importancia as differenças entre o succo prensado e o extracto aquoso quente e frio. Mas, por meio do microscopio, foi possivel verificar que, em geral, o extracto aquoso quente provoca reacções mais profundas do que o extracto aquoso frio. Consideravelmente mais fraco foi, todavia, o effeito do extracto alcoolico e especialmente o do extracto etherico.

Resumindo os resultados desta parte de nossas experiencias, podemos dizer que as substancias activas se encontram especialmente nas folhas das plantas e se dissolvem mais na agua que no alcool e no ether.

II. A ESPECIFICIDADE DA REACÇÃO

Por outros autores, bem como por um de nós (cf. SILBERSCHMIDT 9,10), já muitas vezes se tem procurado encontrar, nas plantas, substancias cuja natureza chimica tivesse qualquer relação com o seu syste-

ma morphologico. Pois, para explicar as grandes differenças physiologicas entre as unidades systematicas das plantas não basta apenas o conhecimento dos caracteres morphologicos destas unidades; por essa razão, seria de grande importancia o conhecimento das propriedades chimicas, que se poderiam relacionar com a posição systematica das especies.

O grupo dos «hormonios de crescimento», que a principio se considerou como restricto apenas a certas especies, tambem foi encontrado mais tarde em grande numero de plantas, bem como em muitos animaes.

Era porisso de interesse verificar, se talvez a acção dos succos de differentes plantas sobre vagens tinha qualquer relação com a affinidade existente entre essas plantas entre si e a planta de vagem. Uma relação dessa natureza parecia tanto mais provavel, quanto, em experiencias semelhantes HABERLANDT havia encontrado differenças especificas dos succos de varias plantas. De outro lado, WEHNELT e JOST tinham constatado que succos das mais differentes especies de plantas podem estimular a formação das elevações nas camaras de vagens, e que a reacção não permitte uma distincção entre os differentes agrupamentos systematicos.

Assim, depois de termos encontrado os differentes typos macro e microscopicos sob a influencia de varias concentrações de um só succo, pareceu-nos de especial interesse examinar se estes differentes typos da reacção são igualmente provocados pelos succos de todas as especies, ou si se pode observar uma ligação de cada typo ao succo duma determinada especie. Excusado é dizer que sómente series de grande numero de vagens e de differentes concentrações dos succos offerecem a possibilidade de se constatarem differenças eventuaes entre o effeito dos diversos succos, pois a sensibilidade das varias camaras de vagens mostra grandes variações, como já dissemos, e tambem, nos limites de um mesmo typo, existem ainda differentes gráos de intensidade.

Em summa foram examinadas as reacções provocadas pelos succos de:

1 — *Phaseolus vulgaris, Ficus Carica, Musa sapientium* (Experiencia VIII, do dia 3 de Dezembro 1935).

2 — *Canavallia ensiformis, Carica Papaya* e Mata-Matto (Leguminosa, nome scientifico desconhecido)

(Experiencia IX, do dia 5 de Dezembro 1935)

3 — *Canavallia ensiformis* e *Carica Papaya* em differentes concentrações.

(Experiencia X, de 15 de Janeiro e de 2 de Março 1936).

4 — *Canavallia ensiformis* e *Agave americana* (Experiencia XI, de 28 de Março).

5 — *Phaseolus vulgaris, Agave americana* e *Gossypium herbaceum* em differentes concentrações.

(Experiencia XII, de 20-IV).

A partir das primeiras series poude-se verificar:

1.º) que tambem succos de especies de plantas bem afastadas systematicamente das *Papilionaceas,* taes como *Carica Papaya* e *Musa sapientium,* podem provocar reacções.

2.º) que apezar disso, cada especie provoca, na maioria dos casos, um certo typo de reacção, que tem talvez qualquer relação com a affinidade que possa existir entre a planta estudada e a planta de feijão.

Phaseolus vulgaris e *Canavallia ensiformis,* especies bem affins na familia das *Papilionaceas,* causam muitas vezes o typo geral da reacção acima descripto (pag. 135), ao se fazer referencia ao effeito das fortes concentrações dos succos.

Macroscopicamente, este typo é caracterisado pelo facto de tambem a superficie da vagem, que não foi coberta com o succo em experiencia, poder ser affectada de duas maneiras, já sob a forma de uma elevação de paredes inclinadas, ultrapassando os limites da superficie coberta, já formando-se um annel largo ao redor da zona colorida pelo contacto com o succo. Este typo da reacção está figurado macroscopicamente na estampa 23 fig. A, representando uma vista de cima e um córte transversal de uma camara de *Canavallia* tratada com succo da mesma especie (lado esquerdo), e com agua.

O aspecto microscopico tem sua representação (cf. estampa 22, C, *Canavallia* — Mata-Matto), na pagina 135.

Carica Papaya causou em muitos casos o typo 2, descripto na pagina 135. O centro do campo da reacção é deprimido, a margem bem elevada sob a forma dum annel. Ao microscopio verifica-se que a reacção é superficial diminuindo em intensidade do centro para a margem do circulo (Estampa 22, B, *Carica* — H_2O).

As reacções de *Ficus Carica* e *Musa sapientium* foram, na maioria dos casos fracas, aproximando-se mais do typo de *Carica* do que do typo de *Canavallia.* Mata-Matto, ao contrario, provocou muitas vezes reacções profundas, porém não tão distinctas como as de *Phaseolus* e de *Canavallia.*

Duma maneira um pouco mais detalhada vamos discutir agora as experiencias XI e XII, porque essas mostram bem a combinação das influencias das qualidades especifica e da concentração do succo.

No dia 18 de Março, foram, da maneira usual, preparados succos de 15 grs. das folhas de *Agave americana* e de *Canavallia ensiformis* (sempre com addição de 15 cc. de agua distillada). De cada succo (1/1) foram organisadas, por meio da agua distillada, diluições a 1/10 e a 1/100. Foram realizadas 3 series das experiencias, que serviram para comparar o effeito: 1.º) *Canavallia* 1/1 — *Agave* 1/1; 2.º) *Canavallia* a 1/10 — *Agave a* 1/10; 3.º) *Canavallia* a 1/100 — *Agave* a 1/100. Cada serie se compunha de 10 caixas de Petri e cada caixa recebeu 3 pares de metades de camaras.

Os resultados dessas experiencias são resumidos na tabella VII.

TABELLA VII A.

Observações de 20 de Março

	Canavallia						Agave					
	Conc. 1/1		Conc. a 1/10		Conc. a 1/100		Conc. 1/1		Conc. 1/10		Conc. 1/100	
	N.º abs.	%	N.º abs.	%	N.º abs.	%	N.º abs.	%	N.º abs.	%	N.º abs.	%
++	3	10	5	16,6	3	10					2	6,65
+−++												
+	12	40	6	20	9	30					9	30
±	2	6,65	4	13,3	3	10	1	3,3			2	6,65
— ou ?	13	43,35	15	50	15	50	29	96,7	30	100	17	56,6

TABELLA VII B.

Observações de 23 de Março

	Canavallia						Agave					
	Conc. 1/1		Conc. 1/10		Conc. 1/100		Conc. 1/1		Conc. 1/10		Conc. 1/100	
	N.º abs.	%	N.º abs.	%	N.º abs.	%	N.º abs.	%	N.º abs.	%	N.º abs.	%
++	9	31	12	42,8	7	23,3			1	3,58	8	26,62
+−++			1	3,58	1	3,34						
+	8	27,6	13	46,4	13	43,4	4	13,8	6	21,4	16	53,4
±	4	13,8	1	3,58	5	16,7	3	10,35	1	3,58	4	13,31
— ou ?	8	27,6	1	3,58	4	13,31	22	75,85	20	71,5	2	6,66

Podemos deduzir, destas tabellas, que os effeitos dos succos de *Canavallia* e de *Agave* são bem differentes.

Quanto ao effeito do succo de *Canavallia,* a differença entre os 3 estados de diluição é pequena. Na 2.ª observação, o effeito do succo diluido a 1/10 é ainda maior do que o do succo concentrado e a acção do succo diluido a 1/100 é sómente pouco menor.

Ao contrario, o succo concentrado e o succo diluido a 1/10, de *Agave,* quasi não deram reacções. Essa differença bem pronunciada entre os succos de *Canavallia* e de *Agave* (1/1 e 1/10) ficou bem saliente na primeira observação, mas diminuiu, embora pouco, até a ultima observação.

Ao contrario, os succos diluidos a 1/100 de *Canavallia* e de *Agave* provocaram, mais ou menos, a mesma intensidade da reacção. Seria possivel admittir, para explicar esse resultado, que a substancia que tem acção sobre as vagens seja, como a auxina, uma só nas differentes especies, e que ella se encontre em maior concentração no succo de *Agave* do que no succo de *Canavallia?*

A' primeira vista, o resultado da experiencia XI parecia comprovar a hypothese de que o effeito dos succos de differentes especies não é especifico. Não obstante, o exame microscopico mostrou que o effeito do succo concentrado de *Agave* não era negativo, mas que se manifestou sob a forma de uma necrose das cellulas superficiaes, que estimulou uma acção do typo 3 nas camadas profundas. Assim, poder-se-ia explicar a differença entre as reacções dos dois succos, admittindo que o succo de *Agave,* isto é, de uma especie muito afastada do feijão no systema das plantas, conteria muito mais substancias estimulantes de crescimento do que o succo de *Canavallia.* Com isso cahiria a hypothese duma correlação entre a affinidade das especies e a intensidade da reacção. Mas esta hypothese não corresponderia aos dados de nossa tabella, pois no succo de *Canavallia,* que seria mais fraco segundo tal hypothese, a diluição não determinou quasi nenhuma diminuição do effeito, ao passo que, em consequencia de uma diluição do succo de *Agave,* a acção do succo foi muito menos pronunciada. Por essa razão acreditamos que a differença entre os effeitos dos succos das duas plantas está ligada á occorrencia de substancias bem differentes.

O primeiro effeito do succo de *Agave,* segundo já dissemos, é uma acção necrotica; talvez a concentração total do succo de *Agave* seja maior do que a de *Canavallia,* de maneira que as cellulas superficiaes morrem por causa de uma acção hypertonica deste succo. Das cellulas mortas saem substancias que estimulam o crescimento das vivas, sendo esse effeito, no caso de *Agave,* secundario. Ao contrario, no succo de *Canavallia* já preexistem as substancias activas.

Apresentamos agora, em favor desta hypothese, os resultados da experiencia de 20-IV.

Experiencia XII (20 de Abril).

Com 10 grs. de folhas de *Phaseolus vulgaris, Agave americana* e *Gossypium herbaceum* prepararam-se, da maneira usual, succos prensados.

De cada um destes succos fizemos diluições a 1/10 e a 1/100. Preparámos 9 series, sendo 6 de 4, e 3 de 5 caixas. Em cada caixa collocámos 3 pares de metades de camaras de vagens.

As series constituiram-se da maneira seguinte:

1.ª) $\frac{\text{12 pares}}{\textit{Phas.}\ 1/1 - \textit{Goss.}\ 1/1}$; 2.ª) $\frac{\text{12 pares}}{\textit{Phas.}\ \text{a}\ 1/10 - \textit{Goss.}\ \text{a}\ 1/10}$;

3.ª) $\frac{\text{12 pares}}{\textit{Phas.}\ \text{a}\ 1/100 - \textit{Goss.}\ \text{a}\ 1/100}$; 4.ª) $\frac{\text{12 pares}}{\textit{Phas.}\ 1/1 - \textit{Agave}\ 1/1}$;

5.ª) $\frac{\text{12 pares}}{\textit{Phas.}\ \text{a}\ 1/10 - \textit{Agave}\ \text{a}\ 1/10}$; 6.ª) $\frac{\text{12 pares}}{\textit{Phas.}\ \text{a}\ 1/100 - \textit{Agave}\ \text{a}\ 1/100}$;

7.ª) $\frac{\text{15 pares}}{H_2O - \textit{Phas.}\ \text{a}\ 1/100}$; 8.ª) $\frac{\text{15 pares}}{H_2O - \textit{Agave}\ \text{a}\ 1/100}$; 9.ª) $\frac{\text{15 pares}}{H_2O - \textit{Goss.}\ \text{a}\ 1/100}$;

Estas series foram inspeccionadas nos dias 23, 25 e 28 de Abril. A tabella VIII refere-se sómente aos resultados da primeira e da ultima observação. Os numeros da tabella representam a porcentagem das differentes intensidades encontradas em relação ao numero total das metades de camaras de cada serie. Os numeros absolutos não estão annotados, visto que taes numeros, que se relacionam com a porcentagem e o numero total de metades de camaras de cada serie, podem ser facilmente determinados.

TABELLA VIII

	++		+−++		+		±		−		N		++		+−++		+		±		−		N		
	23-IV	28	23	28	23	28	23	28	23	28	23	28	23	28	23	28	23	28	23	28	23	28	23	28	
Serie 1. *Phas.* 1/1	—	8,35	—	8,35	33,3	50	25	25	41,7	8,35	—	—	—	41,7	—	8,35	25	25	33,3	16,63	41,7	8,35	—	—	Serie 1 *Gossyp.* 1/1
Serie 2. *Phas.* 1/10	25	25	8,35	—	25	58,2	41,7	16,65					—	8,35	8,35	—	33,3	50	41,7	41,7	8,35	—	8,35	—	*Gossyp.* 1/10
Serie 3. *Phas.* 1/100	—	—	—	—	—	—	—	25	100	75	—	—	—	—	—	—	—	—	16,5	16,5	83,5	83,5	—	—	*Gossyp.* 1/100
Serie 4. *Phas.* 1/1	—	25	—	—	8,35	50	16,7	8,35	75	8,35	—	8,35	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100	100	*Agave* 1/1
Serie 5. *Phas.* 1/10	—	—	25	8,35	50	75	16,65	16,65	8,35	—	—	—	—	10	—	—	16,65	30	16,65	20	66,6	40	—	—	*Agave* 1/10
Serie 6. *Phas.* 1/100	—	—	—	—	8,35	33,3	—	16,6	91,6	50	—	—	—	—	—	8,35	8,35	16,65	16,65	25	75	50	—	—	*Agave* 1/100
Serie 7. *Phas.* 1/100	—	13,3	—	—	20	13,3	13,3	6,67	66,6	66,6	—	—	—	—	—	—	6,7	—	20	13,3	73,3	86,5	—	—	H_2O
Serie 8. *Agave* 1/10	—	—	—	—	6,65	6,65	13,35	13,35	60	80	20	—	—	—	—	—	13,35	6,65	26,6	13,35	60	80	—	—	H_2O
Serie 9. *Gossyp.* a 1/100.	—	—	—	—	6,65	13,35	26,6	13,35	66,6	73,5	—	—	—	—	—	—	13,3	6,5	20	—	66,6	93,5	—	—	H_2O

Destes resultados podemos tirar tres conclusões importantes:

1.ª) Os succos das mesmas especies, prensados em differentes tempos e de differentes exemplares, provocam sempre sobre vagens, approximadamente o mesmo effeito; assim o succo de *Agave* tambem nesta experiencia causou, em todos os casos, uma necrose das cellulas superficiaes.

2.ª) Com a diluição, o effeito especifico diminue. As reacções macroscopicas provocadas pelos succos a 1/100 de *Phaseolus, Agave* e *Gossypium* não se distinguem bem entre si, nem das reacções causadas por H_2O.

3.ª) Apezar da desigualdade dos objectos de «test», foi possivel verificar certa relação entre a intensidade da reacção e a affinidade que se manifesta entre a planta em estudo e o feijão. Se observarmos, por exemplo, as differentes series feitas com succo diluido a 1/10, a actividade do succo de *Phaseolus* evidencia-se maior, seguida immediatamente pela do succo de *Gossypium,* sendo o mais fraco effeito o causado pelo succo de *Agave.*

Faz uma excepção a essa regra a acção do succo concentrado de *Agave,* que na serie 1 subrepujou o effeito do succo de *Phaseolus.* Mas nas observações macroscopicas sempre existe o perigo — especialmente com succos concentrados — de serem as elevações altas, do typo superficial, mais valorizadas do que as reacções mais geraes, mas menos pronunciadas das do typo I. A superioridade da actividade do succo de *Phaseolus* confirma-se, tambem aqui, no exame microscopico.

TABELLA IX

	Phas. 1/1	Agave 1/1		Phas. 1/1	Goss. 1/1
+++	2	—	+++	4	
++	—	—	++		1
+	2	—	+	1	2
±	1	—	±	1	3
— ou?	—	—	— ou?		1
N	—	5	N	1	

	Phas. 1/10	Agave 1/10		Phas. 1/10	Goss. 1/10
+++			+++		
++		1	++		
+			+	4	1
±	5		±	1	
— ou?			— ou?	1	3
N		4	N		

Surge agora a questão de explicar os resultados obtidos acerca da especificidade do effeito dos succos prensados de differentes plantas.

De um lado, verificamos que succos de plantas bem afastadas do feijão, na escala systematica, taes como *Musa* e *Carica Papaya*, podem provocar um determinado effeito sobre vagens; e, de outro, que os succos de plantas mais affins de feijão parecem possuir uma acção mais intensa.

Até hoje não havia dados experimentaes sufficientes para explicar essa discordancia; julgamos porém, agora, que a concentração total do succo das differentes plantas exerce um papel importante na acção não especifica. O effeito estimulante sobre as cellulas pode ser, sem duvida, provocado por differentes factores (cf. WEHNELT, JOST), mas, pode ser tambem que as plantas affins ao feijão contenham, sob alguma forma, «hormonios de feridas». O effeito destas substancias especiaes pode ser em alguns casos compensado por factores não especificos, assim como talvez pela concentração total do succo. Para esclarecimento desta hypothese aguardamos novas experiencias.

III. A ACÇÃO DOS SUCCOS DAS GALHAS NATURAES DAS PLANTAS

A attenção dos botanicos e dos entomologistas foi sempre attrahida pelo facto de produzirem as picadas dos differentes insectos e os ataques de alguns fungos effeitos proliferativos especificos sobre os hospedes de taes parasitas. Um dos objectos deste trabalho é tambem o estudo das causas dessas neoformações especificas.

Até hoje completamos a observação apenas de 3 series de experiencias, acerca das differenças do effeito dos succos de galhas, e de plantas da mesma especie, sem galhas.

As experiencias foram feitas nos dias 29 de Abril. (Exp. XIII) 18 de Maio (Exp. XIV) e 9 de Junho (Exp. XV).

Nos tres casos as experiencias foram feitas com galhas do typo das excrescencias das folhas («Beutelgalle»), na primeira serie das folhas de uma *Myrtacea* indeterminada, nas duas outras series, das folhas de uma *Verbenacea (Lantana Camará* L.; det. J. F. TOLEDO).

Apenas se verificou a questão relativa a serem ou não mais efficazes os succos fornecidos pelas galhas, sobre as vagens, do que os succos prensados das folhas não atacadas. Essas experiencias deram resultados interessantes:

a) na primeira serie os succos foram obtidos de 5 grs. de galhas e de 5 grs. das partes das mesmas folhas, isentas de taes neoformações. Foram preparadas, com o auxilio desses 2 succos, 3 series de experiencias para comparar o effeito de:

1.º) H_2O — Succo das folhas (4 caixas de Petri com 12 pares de metades de camaras).

2.º) H_2O — Succo de galhas (4 caixas de Petri com 12 pares de metades de camaras).

3.º) folha — galha (8 caixas com 24 pares de metades de camaras).

As reacções em geral ficaram fracas, com os dois succos, mas o effeito do succo das galhas foi um pouco mais accentuado.

b) A experiencia de 18 de Maio distinguiu-se em differentes pontos, do ensaio antecedente (a).

Foram utilisadas folhas cobertas de galhas, de *Lantana Camará* L., e folhas, sem galhas, de exemplares perfeitamente sadios, da mesma especie. As galhas foram retiradas por meio de um furador de rolhas; pedaços do mesmo diametro foram retirados do mesmo modo, de folhas sadias.

Para preparar succos de folhas e de galhas usaram-se 4 grs. do material fresco, com addicção de 4 cc. de agua dist.

E' fóra de duvida que foram necessarios muito mais discos das folhas sadias, que das galhas, estas relativamente muito mais pesadas.

A distribuição das 3 series foi a mesma que na primeira experiencia. Os resultados macro-e microscopicos da serie Folha — Galha se encontram resumidos na tabella X.

TABELLA X

	Obs. macroscopicas				Obs. microscopicas	
	Folha		Galha		Folha	Galha
	22. V	24. V	22. V	24. V		
+++						1
++−++				1		
++	7	12	1	4	2	1
+−++	4	1	2	3		1
+	7	10	13	14	5	4
±			2	1	3	4
−	13	6	12	7	1	1
N						

Podemos verificar nesta tabella, que pelo aspecto macroscopico as reacções fortes do succo das folhas sadias eram mais frequentes do que as do succo das galhas.

Ao microscopio a differença entre as intensidades provocadas pelos succos de folhas e de galhas foi menos pronunciada, mas aqui tambem o effeito do succo das galhas não foi mais elevado do que o do succo das folhas testemunhas.

Este resultado foi para nós muito surprehendente, porquanto tinhamos admittido como geralmente provavel, que as galhas se distinguissem por um conteúdo mais elevado, de substancias estimulantes do crescimento das cellulas. Por essa razão, pensámos, que talvez esse resultado sómente tenha sido conseguido pelo facto de não serem verdadeiramente comparaveis os dois succos por nós preparados. E' que, para obter o mesmo peso de discos de galhas e de discos de folhas sadias dos mesmos diametros, foi preciso, naturalmente, um numero muito maior destes ultimos pedaços. Permanece assim a possibilidade de ter sido o effeito do succo das folhas sadias causado por uma desharmonia do material.

Para verificar esta hypothese servimo-nos da mesma especie das plantas e das galhas na experiencia de 9 de Junho, alterando sómente a technica da preparação dos succos.

c) 131 discos de galhas e 131 discos de folhas de plantas sadias, do mesmo diametro, tambem de *Lantana Camará,* foram triturados no almofariz.

As galhas pesavam 6,47 grs. e os pedaços das folhas sadias, 1 gr. Assim, a pasta das galhas foi completada com 6,47 cc. e a pasta das folhas com 1 cc. de agua distillada. Por meio destes succos foram preparadas 3 series de experiencias: 5 caixas de Petri serviram (com 15 pares de metades de camaras) para comparar o effeito de H_2O e do succo de galhas com o das folhas. Usaram-se 10 caixas de Petri com 30 pares de pedaços de vagens para comparar a acção dos succos de folha e de galha. Foram observadas as reacções nos dias 12 e 15 de Junho. Os resultados da ultima observação acham-se resumidos na Tabella XI.

TABELLA XI

	H_2O	Galha	H_2O	Folha	Galha	Folha
+++				1		
++--+++						
++		1		8	1	5
+−++		1		1		2
+	4	5	5	4	7	15
±	3	1	4		6	
— ou?	8	7	5		10	2

Tambem por esta tabella podemos verificar que as reacções causadas pelo succo das folhas sãs, são mais fortes do que as provocadas pelo succo das galhas.

Este resultado se confirmou tambem pelo exame microscopico. A' vista de terem sido, os succos de folhas e de galhas, neste caso, preparados com o mesmo numero de pedaços, tal resultado parece indicar que de facto o conteúdo das galhas em substancias estimulantes do crescimento é verdadeiramente pequeno. Não pudemos saber, pelo menos até hoje, se essas condições se encontram tambem em outras galhas. Talvez a pobreza das nossas galhas em substancias estimulantes do crescimento se possa explicar pelo facto de se terem consumido na formação das galhas, essas substancias especiaes, quiçá primeiramente existentes em maiores quantidades.

SUMMARIO

1. O processo da formação de «galhas artificiaes» na superficie das camaras de vagens é influenciado não só pela temperatura como muito especialmente pela concentração dos succos applicados.

2. Concentrações fortes causam um typo da reacção que se distingue por um alongamento das camadas de cellulas profundas; concentrações fracas provocam mais reacções superficiaes e marginaes.

3. Distinguem-se tambem typos da reacção causadas pelos succos de especies differentes. Em geral, os succos de plantas bem affins a *Phaseolus vulgaris* no systema das plantas, provocam nestes fortes reacções.

4. Mostraram-se activos os succos de hastes, raizes, cotyledones, fructas (sem sementes) e especialmente os de folhas das plantas. Com succos prensados de petalas, sementes e de pollen, o effeito foi menor.

5. As substancias podem ser mais facilmente extrahidas dos orgãos por meio de agua quente do que de alcool quente ou de ether quente.

6. Em um estudo iniciado sobre as galhas naturaes das plantas, os succos das galhas das folhas do Cambará de espinho *(Lantana Camará,* L. fam. *Verbenaceae)* deram resultados mais fracos do que os succos correspondentes, das folhas sadias da mesma especie.

ZUSAMMENFASSUNG

Die von WEHNELT *beschriebene und von* JOST *neuerdings untersuchte Reaktion der Innenseite von Bohnenfruchtkammern auf Pflanzenpressäfte («Wundhormone») wurde von uns zur Klärung der folgenden 3 Fragengruppen herangezogen:*

1. Welche äusseren Faktoren üben Einfluss auf den Verlauf der Reaktion?

2. Ist die Wirkung der Wundhormone artspezifisch?

3. Lassen sich in Pflanzengallen wachstumsstimulierende Substanzen nachweisen?

ad. 1) Durch die Temperatur wird nicht nur die Geschwindigkeit, sondern auch die Intensität der Reaktion beeinflusst. Die Temperatur von 20 Grad wurde als besonders günstig befunden (Vgl. fig. 1).

Unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen der auf die Bohnenkammern aufgetragenen Säfte treten verschiedene Typen der Reaktion auf, die sich makroskopich und mikroskopisch klar voneinander trennen lassen. Tafel 21 stellt das Reaktionsergebnis — im mikroskopischen Querschnittpraeparat — unter dem Einfluss von Wasser (A), niederen (B) und hohen (C) Konzentrationen von Canavallia saft dar.

Die Verteilung der wirksamen Substanzen auf die einzelnen Organe ist insofern ungleichmässig, als Presssäfte von Blüten und Samen als praktisch unwirksam befunden wurden, während Stengel und Wurzeln etwas weniger wirksame Presssäfte als Blätter lieferten. Die Löslichkeit der wirksamen Substanzen ist grösser in Wasser als in Alkohol und Äther.

Ad. 2) Die Wirksamkeit der Presssäfte der einzelnen Pflanzenarten zeigt ähnliche Abstufungen wie die Wirksamkeit der einzelnen Konzentrationen eines Saftes. Die Wirksamkeit des Saftes einer Pflanzenart bleibt in verschiedenen Versuchsreihen konstant.

Säfte von Pflanzenarten, die systematisch der Bohne nahestehen (Phaseolus, Canavallia, Mata-Matto), erzeugen in der Regel den für starke Konzentrationen kennzeichnenden Reaktionstyp (Vgl. Tafel 22, Fig. C). Säfte systematisch der Bohne fernstehender Pflanzenarten führten in den von uns untersuchten Fällen zur Ausprägung schwächerer Reaktionstypen (Vgl. Tafel 22, Fig. B): Carica Papaya, Musa sapientium, Gossypium herbaceum.

Ad. 3) Der aus Beutelgallen der Blätter von Lantana Camará L. hergestellte Presssaft war weniger wirksam als der aus dem gleichem Frischgewicht (Versuch XIV) und als der aus der gleichen Stückanzahl (Versuch XV) gesunder Blätter hergestellte Pressaft.

BIBLIOGRAPHIA

1 — Haberlandt, G. — 1922 — Über Zellteilungshormone und ihre Beziehung zur Wundheilung, Befruchtung, Parthenogenesis und Adventivembryologie. Biol. Zbl., 42, 145.

2 — HEYN, A. N. Y. — 1935 — The chemical nature of some growth hormones as determined by the diffusion method. Proc. K. Akad. Wetensch. Amsterdam, **38**, 1074-1081.
3 — HITCHCOCK, A. E. and ZIMMERMANN, P. V. — 1935 — Absorption and movement of synthetic growth substances from soil as indicated by the responses of aerial parts. Contrib. Boyce Thompson Inst., **7**, 447-476.
4 — JOST, L. — 1935 — Wuchsstoff und Zellteilung. Ber. d. dtsch. Bot., Ges., **53**, 733.
5 — KLEIN, G. — 1928 — Praktikum der Histochemie. Wien, Springer.
6 — KRASSINSKY, N. I. und ANDREJEWA, E. D. — 1935 — Über die Wirkung des Aethylens und des Acethylens auf die Bildung der Wurzeln. Gartenbauwissensch., **9**, D. 21, 479-488.
7 — LAIBACH, F. und FISCHNICH, O. — 1935 — Künstliche Wurzelneubildung mittels Wuchsstoffpaste. Ber. d. dtsch. Bot. Ges., **53**, 528-539.
8 — REICHE, H. — 1924 — Über Auslösung von Zellteilungen durch Injektion von Gewebesäften und Zelltrümmern. Z. Bot., **16**.
9 — SILBERSCHMIDT, K. — 1935 — Die Abhängigkeit des Pfropferfolges von der systematischen Verwandtschaft der Partner. Zsch. f. Botanik, **29**, 65-137.
10 — SILBERSCHMIDT, K. — 1936 — A importancia da «especie» no systema das plantas e a tentativa da sua delimitação por novos methodos. Arch. Inst. Biol. S. Paulo, **7**, 33-50.
11 — WEHNELT, B. —1927 — Untersuchungen über das Wundhormon der Pflanzen. Jb. f. wiss. Botanik, **66**, 773-813.
12 — WENT, F. W. — 1927 — Wuchsstoff und Wachstum. Proefschrift, Amsterdam.
13 — ZIMMERMANN, P. W. and HITCHCOCK, A. E. — 1936 — The response of roots to «root forming» substances. Contrib. Boyce Thompson Inst., **7**, 439-445.
14 — ZIMMERMANN, P. W. and WILCOXON, F. — 1935 — Several chemical growth substances which cause initiation of roots and other responses in plants. Contrib. Boyce Thompson Inst., **7**, 209-229.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 21

Microphotographias de secções de camaras de vagens tratadas com discos de agar. Augmento 55 x.

Fig. A — O effeito do disco 10, de um cylindro de agar mergulhado em agua. (Serie *Agar feijão*-Agar H_2O). Experiencia de 20 de Maio de 1936.
Fig. B — O effeito do disco 10, de um cylindro de agar mergulhado em succo de Phaseolus. (Serie *Agar feijão*-Agar H_2O). Exp. de 20-5-36.
Fig. C — O effeito do disco 2, de um cylindro de agar mergulhado em succo de Phaseolus. (Serie *Agar feijão*-Agar H_2O). Exp. de 20-5-36.

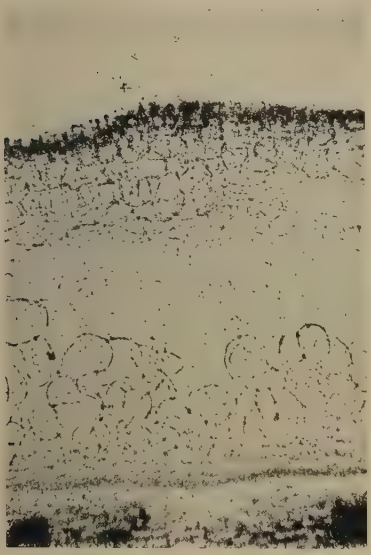
Estampa 22

Microphotographias de secções de camaras de vagens tratadas com agua e com succos de plantas.

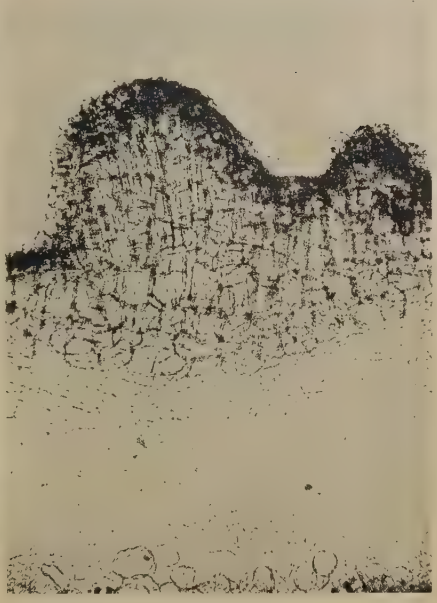
Fig. A — O effeito da agua. (Serie *Agua*-Canavallia). Augmento 80 x. Experiencia de 6 de Dezembro de 1935.
Fig. B — O effeito do succo de *Carica Papaya*. (Serie *Carica*-H_2O). Augmento 80 x. Exper. de 6-12-35.
Fig. C — Effeito do succo de *Canavallia ensiformis*. (Serie-*Canavallia* — M. Matto). Augmento 100 x. Experiencia de 6-12-35.

Estampa 23

Fig. A — Influencia do succo de *Canavallia* sobre uma vagem de *Canavallia*, vista de cima e em córte transversal. Ampliação 1/1. Experiencia de 16 de Janeiro de 1936.
Fig. B — Influencia da temperatura sobre a intensidade da reacção. Ampliação 1:1 $^1/_2$. Exper. de 8-7-1936.
Fig. C — Typos de reacção causados pelos succos de *Canavallia*, *Carica*, H_2O e Mata-Matto. Ampliação 1/1. Experiencia de 6-12-35
Fig. D — Typos de reacção causados pelos extractos frios, de agua, alcool e ether. Ampl. 1:1 $^1/_2$. Experiencia de 7 de Julho de 1936.
Fig. E — Typos de reacção causados pelos extractos das series agua fria-agua quente e agua quente-alcool quente. Ampl. 1:1 $^1/_2$. Exper. de 7-7-36.



A



B

C

CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DOS MEMBRACIDEOS NEOTROPICOS

POR

J. P. da Fonseca

Trabalho do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 25 figuras no texto

O presente trabalho trata de cinco novas especies para a sciencia e de uma synopsis das especies brasileiras do genero *Spongophorus*.

Leioscyta niger n. sp. (Figs. 1-2)

♀ Colorido geral fundamental piceo-escuro, quasi negro; tegmina maculados de pardo-escuro, com a extremidade apical ligeiramente amarellada; tarsos castanho-claros.

Cabeça densa e grossamente punctuada, pubescente, larga e profundamente deprimida no vertex; expansões genaes levemente arqueadas na margem externa, ligeiramente attenuadas para a extremidade apical, terminadas em ponta angular, obtusa; ocellos amarello-claros, afastados entre si, equidistantes dos olhos e da margem superior da cabeça; sob os ocellos notam-se, em cada lado da fronte, uma pequena depressão preta, glabra e luzidia; olhos negros, quasi tão longos quanto largos; clypeo triangular, grossa e densamente punctuado, com as margens da metade distal direitas, levemente levantadas, extremidade apical terminada em angulo quasi obtuso.

Pronoto mais curto do que o abdomen, piceo-escuro, ligeiramente convexo e afilado para a parte posterior, densamente punctuado, com leve rugosidade longitudinal, luzidio, provido de pêlos finos, curtos, dispersos, sedosos e fulvescentes. Visto de cima, o pronoto apresenta-se mais elevado e convexo na região dorsal, entre os angulos humeraes, cuneiforme para a parte posterior e terminado em ponta quasi aguda; linha mediana levemente saliente na frente do pronoto formando uma pequena carena, que se acha ladeada por seis pequenas rugas, tres em cada lado, algumas ramificadas. De perfil, o pronoto apresenta-se com a linha de contorno dorsal apenas levemente sinuada.

Metopideo com leve depressão transversal na região basal.

Angulos humeraes com os cantos externos salientes e obtusos.

Tegmina pretos, com 8-9 maculas pardo-amarelladas; a margem apical da mesma côr, levemente hyalina.

Azas cinereo-claras, hyalinas, com nervuras pardacentas.

Abdomen negro, densamente punctuado, mate, com a margem posterior dos segmentos de côr castanho-escura, liza e luzidia.

Pernas pretas, as tibias do primeiro e segundo pares alaranjadas e as do terceiro par providas de espinhos fortes, serrilhados; tarsos flavescentes; unhas pretas.

A femea assemelha-se ao macho: é porém maior.

Comprimento total, da margem anterior do pronoto á extremidade dos tegmina, ♀: 5 mm.; ♂: 4 mm.; da margem anterior do pronoto á extremidade do abdomen, ♀: 4 mm.; ♂: 3 mm.; comprimento do pronoto, ♀: 4 mm.; ♂: 3 mm.; largura entre os angulos humeraes, ♀: 3 mm.; ♂: 2 mm.

Typo (♀ e ♂) pertencente á collecção do Instituto Biologico, São Paulo, Brasil. Paratypos na collecção do autor.

Localidade: São Paulo, Brasil. E. SCHWEBEL, leg.

Planta hospedeira:

A presente especie approxima-se muito de *L. humeralis* GODING. Differe porém desta principalmente por ser maior, pelo pronoto consideravelmente mais curto do que o abdomen, ruguloso, pela ausencia de carenas lateraes e pela linha mediana levemente saliente. Visto de perfil, o pronoto apresenta-se com a linha de contorno dorsal apenas levemente sinuada, somente com fraco declive na região anterior, sobre o metopideo.

Tylopelta appendiculata n. sp. (Figs. 3-6)

♀. Colorido geral testaceo-alaranjado, com a frente do pronoto e a cabeça levemente pardacenta.

Cabeça tão larga quanto longa, fina e densamente punctuada, coberta de densa pilosidade fina, sericea e flavescente; região frontal marcada por um sulco longitudinal, estreito e pouco profundo; expansões geneaes tão longas quanto o clypeo, dilatadas na margem externa em angulo obtuso, terminadas na extremidade apical em angulo agudo; ocellos amarello-claros, luzidios, equidistantes entre si e dos olhos, mais proximos da margem superior da cabeça; olhos globulosos, com as corneas manchadas de pardo; margem superior da cabeça levemente arqueada; clypeo tão largo quanto longo, trianguliforme, com a margem anterior arredondada e ligeiramente marginada.

Pronoto testaceo-alaranjado, cuneiforme, não ultrapassando a extremidade do abdomen, grosso e densamente punctuado, coberto de pilosidade fulvescente e brilhante. Sobre o dorso anterior do pronoto notam-se sete carenas, uma central, duas lateraes, maiores, e quatro sublateraes, menores. Carena central sensivelmente desenvolvida ao longo da linha mediana, tornando-se mais pronunciada na região anterior do pronoto, formando um pequeno appendice deprimido, cuneiforme-arredondado e dirigido para a frente. Carenas lateraes desenvolvidas, na região anterior tão altas quanto a carena mediana, em ligeiro declive para a região posterior, attingindo a margem lateral e mediana do pronoto. Carenas sublateraes pouco desenvolvidas e levemente sinuadas. Visto de perfil, tem o dorso do pronoto em linha trisinuada com forte depressão no terço posterior.

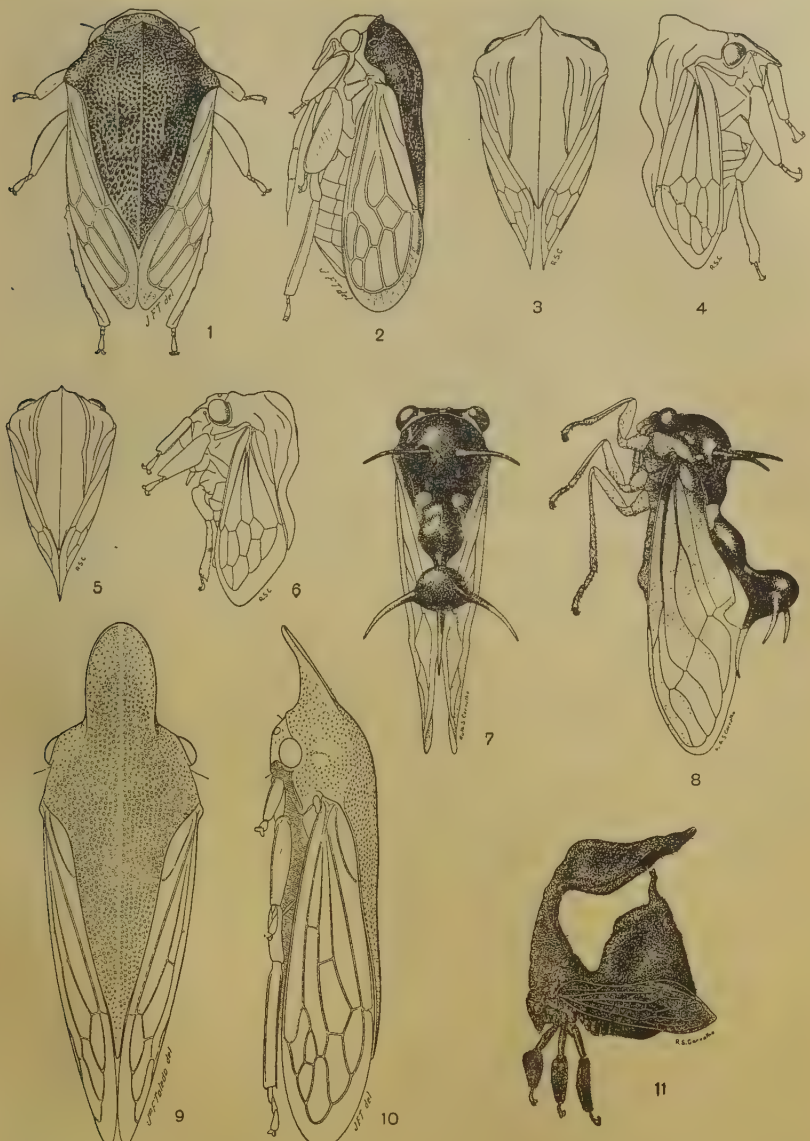
Metopideo transversalmente deprimido.

Angulos humaraes proeminentes, arredondados, encimados por uma pequena carena semitransversal.

Pleuras testaceo-alaranjadas, cobertas de densa pillosidade cerdosa e flavescente-clara.

Abdomen, na parte superior, pardo-avermelhado, com os segmentos glabros e finamente punctuados; na parte inferior, testaceo-alaranjado, provido de densa pilosidade cerdosa, flavescente-clara.

Tegmina testaceo-alaranjados, opacos, punctuados e pubescentes na base e metade da região costal; partes restantes cinereo-claras, hyalinas.



Figs. 1 e 2 — *Leioscyta niger* n. sp. × 10. Figs. 3 e 4 — *Tylopelta appendiculata* n. sp. ♀ Figs. 5 e 6 — *Tylopelta appendiculata* n. sp. ♂. Figs. 7 e 8 — *Heteronotus flavomaculatus* n. sp. ♀, × 4. Figs. 9 e 10 — *Kronides oglolini* n. sp. ♀, × 10. Fig. 11 — *Spongophorus atratus* n. sp. ♀

Pernas testaceo-claras, ligeiramente pubescentes; tibias do par mediano dilatadas; as do par posterior trazem, no lado externo, uma série de pequenos espinhos conicos, negros, recumbentes, tendo cada um delles, na base posterior, um pequeno pêlo cerdiforme.

Comprimento total, da extremidade anterior do pronoto á extremidade dos tegmina, ♀: 5 mm.; ♂: 4 mm.; comprimento do pronoto, da extremidade anterior á posterior, ♀: 4 mm.; ♂: 3 mm.; largura total do pronoto, entre os angulos humeraes, ♀: 3 mm.; ♂: 2 mm. ♂ differe da ♀ pelos seguintes caracteristicos: é menor, provido somente de duas carenas postlateraes; carena mediana não desenvolvida na frente do pronoto, sendo nesta região manchada de preto; carenas lateraes convergentes na frente do pronoto, quasi formando um semicirculo. Cabeça com larga mancha preta na região frontal. Visto de perfil, tem a linha de contorno do dorso do pronoto levemente sinuada.

Typo (♀ e ♂) pertencentes á collecção do autor.

Localidade: Tapéra, Pernambuco. D. B. PICKEL, leg.

A presente especie é affim de *S. monstrosa* FAIRM., da qual differe principalmente por ser maior, pelo seu colorido uniforme testaceo-alaranjado, por trazer no protorax oito carenas, sendo a mediana desenvolvida na frente do pronoto em um appendice curto e deprimido.

Heteronotus flavomaculatus n. sp. (Figs. 7-8)

♀. Cabeça transversal, subtriangular, castanho-escura, tão larga quanto o pronoto, glabra, luzidia, apresentando tres faixas amarello-claras, sendo uma mais larga ao longo da linha mediana, abrangendo o clypeo, e duas lateraes, mais estreitas, uma em cada lado, ao longo da margem externa das expansões geraes. Nos angulos postero-superiores da cabeça nota-se, ainda, uma pequena macula amarella. Região vertical apresentando uma depressão pouco profunda, em fórma de meio circulo, cuja concavidade se acha voltada para a parte inferior da cabeça, abrangendo os ocellos; região frontal levemente elevada e convexa transversalmente; expansões genaes com as margens externas bisinuadas; clypeo oblongo, com leve convexidade transversal e terminado em ponta arredondada provida de numerosos pêlos cerdiformes e flavescentes; olhos proporcionalmente desenvolvidos, globulosos, oblongos, transversaes e de côr pardacenta; ocellos circulares, translucidos, côr de ambar e mais afastados dos olhos do que entre si; apparelho buccal de côr ferrugineo-clara, com o apice negro e alcançando a extremidade basal do trochanter do segundo par de pernas.

Pronoto glabro, liso, luzidio, de côr castanho-clara, maculado de amarello, sinuado nas margens lateraes.

Processo pronotal anterior alargado nas margens lateraes, elevado e semiglobular no centro, notando-se, em cada lado, nas regiões antero-lateraes e entre os angulos supra-humeraes e base do metopideo, pequena depressão assignalada por uma linha direita e levemente sulcada; espinhos supra-humeraes de côr negra, tão longos quanto o processo pronotal anterior, equidistante entre si e das margens lateraes do pronoto, divergentes, ligeiramente arqueadas e voltados para a parte posterior do pronoto, alargados na base, sensivelmente afilados para a extremidade apical, terminados em ponta aguda. De perfil, nota-se na parte posterior do processo pronotal anterior uma leve depressão seguida de uma entumescencia formando um pequeno nodulo.

Processo pronotal posterior binodoso, separado do processo anterior por uma larga depressão transversal; nodulo anterior tão longo quanto largo, levemente elevado, alargado na base, bruscamente constricto na parte posterior; nodulo posterior mais desenvolvido do que o lobulo anterior, globuliforme, elevado na parte superior, provido de tres espinhos, dois mais curtos implantados nas partes lateraes, ligeiramente curvados e dirigidos para traz e para baixo, e um, mais alongado, implantado na parte postero-inferior, levemente convexo e dirigido para baixo.

Sobre o pronoto notam-se quatro manchas amarellas, lateraes, duas pequenas, anteriores, sobre os angulos humeraes e duas posteriores, maiores, triangulliformes, localizadas nos lados da depressão existente entre o primeiro e segundo processo pronotal. Os espinhos do processo pronotal posterior são amarellos no terso anterior e terminados em ponta preta.

Flancos amarellos, com o primeiro metasternal e a extremidade superior do episterno de côr castanha-escura, quasi negra.

Tegmina de colorido geral ferrugineo-claro, hyalinos luzidios; na região basal opacos, finamente punctuados, de côr castanho-escura; no centro desta região nota-se uma larga faixa amarella; veias subcostal e radial com a secção basal castanho-escura.

Azas hyalinas, ferrugineo-claras, com as veias castanho-escuras.

Abdomen flavescente, com a parte superior levemente sombreada de pardo.

Patas de côr ferruginea, com a extremidade dos tarsos negra.

Comprimento total, da fronte á extremidade do abdomen, 9 mm.; da fronte á extremidade do espinho posterior, 10 mm.; tegmina, 11 mm.; largura entre os angulos humeraes, 3 mm.

Typo (♀) pertencente á collecção do Instituto Biologico do Estado de S. Paulo.

Localidade: S. Paulo, Brasil. E. Schwebel, leg.

A presente especie é proxima de *Heteronotus armatus* Laport, da qual differe principalmente pelo colorido da cabeça, que é preto, notando-se na fronte uma faixa longitudinal amarella e outras duas da mesma côr ao longo das expansões genaes; pela ausencia de estrias amarellas no pronoto e pela côr geral do processo pronotal posterior, que é castanho-escuro, uniforme.

Kronides ogloblini n. sp. (Figs. 9-10)

♀. Colorido geral castanho-escuro, uniforme, com a extremidade dos tegmina ferruginea-amarellada.

Cabeça mais larga do que longa, ligeiramente convexa na região frontal, fina e densamente punctuada, luzidia, provida de pilosidade fina, curta e dispersa; expansões genaes desenvolvidas, tão largas quanto o clypeo, ligeiramente arqueadas na margem externa e terminadas em ponta arredondada; clypeo de forma quadrangular, mais largo do que longo, glabro, liso e luzidio, rematado anteriormente em angulo obtuso e largamente marginado; ocellos de formato perfeitamente espherico, côr de ambar-clara, luzidios, afastados entre si e mais proximos das expansões genaes; olhos ligeiramente oblongos, pardo-escuros.

Pronoto convexo, densa e grossamente punctuado, glabro e luzidio, alargado na região supra humeral, estreitado gradativamente para a parte pos-

terior, onde termina em ponta extremamente afilada; região anterior desenvolvida em um appendice dirigido para a frente, ligeiramente inclinado para baixo, largo, espatulado, concavo na parte superior, convexo na inferior, com as margens lateraes levemente voltadas para cima, paralellas e direitas, extremidade apical em ponta arredondada e levemente retusa. Carena mediana ausente, simplesmente assignalada pela linha longitudinal, que se apresenta mais alargada no lado inferior do appendice pronotal; flancos do pronoto, entre a base do appendice pronotal e os olhos, deprimidos, providos de pequena area calliginosa, plana, lisa e luzidia; angulos humeraes em leve saliencia arredondada.

Tegmina opacos, de côr castanho-escura, com o terço apical ferrugineo-claro, ligeiramente translucido.

Azas hyalinas, com as veias pardacentas.

Pleuras e lado ventral do corpo castanho-escuros, providos de pelosidade densa e flavescente.

Pernas castanho-escuras.

♂ assemelhando-se a ♀, sendo porém menor.

Comprimento total, do apex do appendice pronotal á extremidade dos tegmina, ♀: 10 mm.; ♂: 8 mm.; comprimento do pronoto, ♀: 8 mm.; ♂: 6 mm.; largura entre os angulos humeraes, ♀: 3 mm.; ♂: $2^1/_2$ mm.

Cotypos (2 ♀ e 3 ♂) na collecção do autor.

Localidade: Lorêto, Missiones, Republica Argentina.

Dr. A. A. Ogloblin, leg., em 16-V-936.

Planta hospedeira: *Eryngium* sp.

Dedico a presente especie ao entomologista e prezado amigo Dr. A. A. Ogloblin.

Esta especie approxima-se de *K. cochleata* Schmidt, da qual se distingue pelo processo pronotal que tem a forma de espatula, destituido de carena longitudinal, e pelas margens lateraes, que são levemente inclinadas na porção anterior, bem como pela margem anterior do clypeo, que é largamente marginada.

Spongophorus atratus n. sp. (Fig. 11)

♀ Colorido geral fuliginoso, uniforme; tarsos flavescentes.

Cabeça alongada, ligeiramente convexa no centro, grossa e dispersamente punctuada, cada punctuação provida de um pêlo curto, cerdoso, e côr flavescente; expansões genaes alcançando o primeiro terço do comprimento total do clypeo, ligeiramente arredondadas na extremidade distal, com as margens lateraes levemente sinuadas a marginadas; região frontal levemente convexa; vertex com duas depressões em cada lado e junto á margem superior da cabeça; clypeo ligeiramente alargado para a extremidade distal, com a extremidade terminal truncada, provida de um facho de pelos cerdiformes, flavescentes; olhos oblongos, ligeiramente riniformes, com as corneas centraes pardo-escuras e as circunfluentes pardo-claras; ocellos relativamente desenvolvidos, globulosos, côr de ambar clara, translucidos, afastados entre si e mais proximos dos olhos.

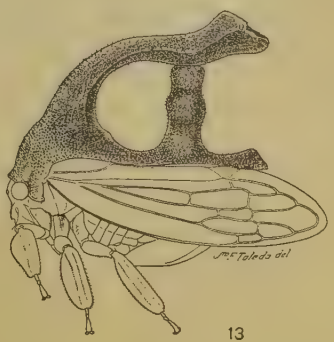
Pronoto densa e cerradamente punctuado, provido de pilosidade curta, fina, dispersa e flavescente.

Processo pronotal anterior alargado na região basal, elevado na metade anterior, inclinado para traz na posterior; de perfil, apresenta-se sen-

sivel e progressivamente afilado para a região mediana, onde se apresenta mais constricto e perfeitamente cylindrico, tornando-se novamente alargado em dilatação compressa, que se afila gradativamente para a extremidade apical, onde termina em ponta quasi aguda; visto de cima, apresenta-se com a extremidade apical dilatada, deprimida, arrematada em ponta bisinuada; linha mediana e carenas lateraes sensivelmente salientes, pardo-amarelladas.

Processo pronotal posterior provido de um nodulo dorsal, erecto e comprimido; visto de perfil, apresenta-se de formato mais ou menos triangular, trazendo no angulo superior um appendice digitiforme erecto, terminado em ponta bifida; parte anterior em linha convexa e sinuada, e a posterior em linha direita e em declive abrupto.

12



13

Fig. 12 — *Spongophorus cinereus* FONS., segundo FONSECA. Fig. 13 — *S. rufescens* FONS., segundo FONSECA.

Metopideo levemente convexo, com leve depressão transversal na parte superior e outra, pronunciada, na inferior; esta depressão forma, nas partes antero-lateraes, na frente dos angulos humeraes, um circulo que orla uma area saliente, em forma de callo, glabra e luzidia.

Angulos humeraes proeminentes, em ponta quasi aguda.

Tegmina castanho-escuros, opacos, com as cellulas basaes 1 e cellula discoidal 9 providas pilosidade fina e densa.

Pernas com os femures glabros e luzidios; tibias densamente punctuadas e providas de compacta pilosidade pardo-amarellada, as do primeiro par mais dilatadas e com a expansão exterior em angulo obtuso; tarsos finamente pilosos, de côr pardo-ferruginea.

Comprimento total, da margem anterior do pronoto á extremidade dos tegmina, 9 mm.; comprimento da margem anterior do pronoto á extremidade do processo pronotal anterior, 12 mm.; espaço entre a extremidade do processo pronotal anterior e a extremidade dos tegmina, 10 mm.; largura basal do

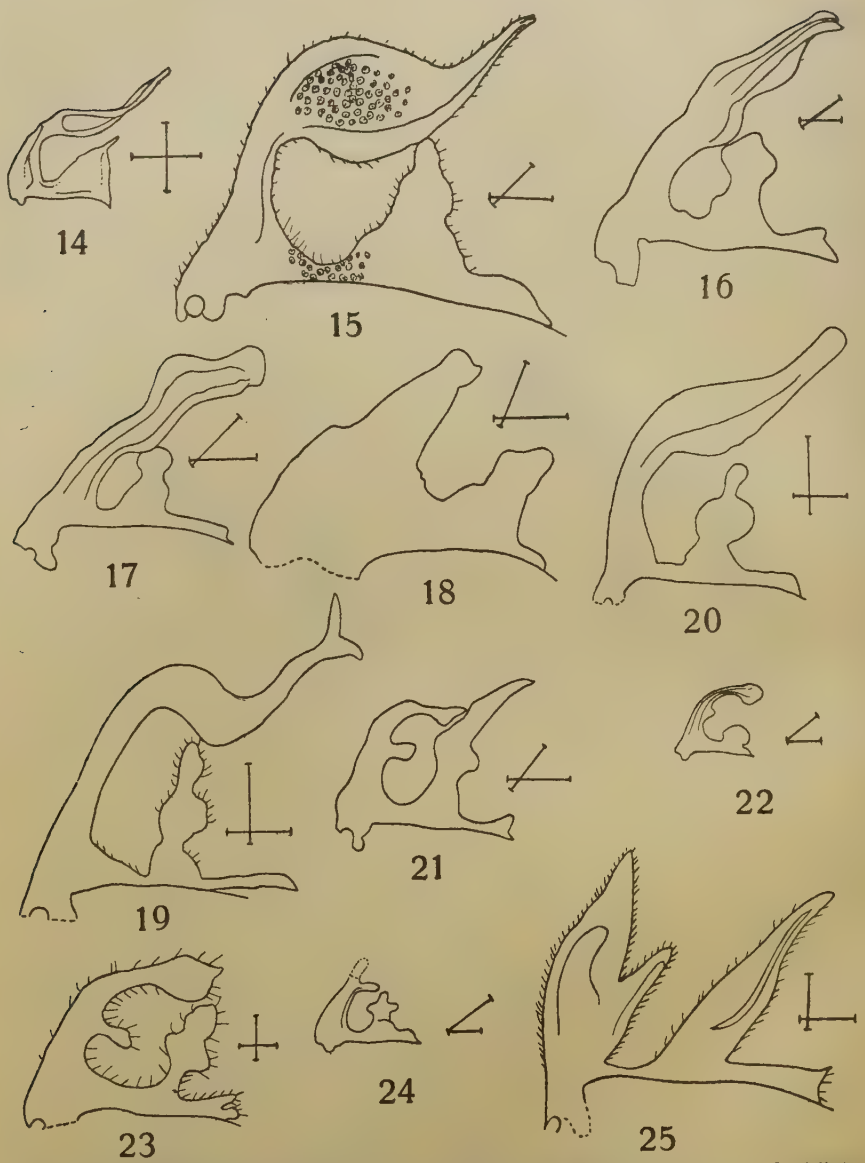


Fig. 14 — *Spoagophorus mirabilis* FAIRM., segundo FAIRMAIRE. Fig. 15 — *S. foliatus* FUNK., segundo FUNKHOUSER. Fig. 16 — *S. undulatus* WALKER, ♂, segundo FOWLER. Fig. 17 — *S. undulatus* WALKER, ♀, segundo FOWLER. Fig. 18 — *S. ridiculus* WALKER, segundo BUCKTON. Fig. 19 — *S. paradoxus* GERMAR, ♂, segundo BUCKTON. Fig. 20 — *S. paradoxus* GERMAR, ♀, segundo BUCKTON. Fig. 21 — *S. guerini* FAIRM., segundo FOWLER. Fig. 22 — *S. spatulatus* FAIRM., segundo FAIRMAIRE. Fig. 23 — *S. biclavatus* WEST., segundo FOWLER. Fig. 24 — *S. clavarius* FAIRM., segundo FAIRMAIRE. Fig. 25 — *S. lividus* BUCK., segundo BUCKTON.

processo pronotal posterior, 5 mm.; altura do mesmo, 11 mm.; largura entre os angulos humeraes, 3 mm.

Typo (1 ♀) pertencente á collecção do autor.

Localidade: Peruhybe, Estado de S. Paulo. H. ZELLIBOR, leg.

Esta especie é affim de *Spongophorus mirabilis* FAIRM., da qual differe pela constituição, bem diversa, do nodulo dorsal do processo pronotal posterior, que tem a parte anterior entumescida, formando uma convexidade bem pronunciada, undulada, e a posterior mais ou menos direita, em declive abrupto; tambem o appendice digitiforme do angulo posterior é erecto e terminado em ponta bifida.

SYNOPSIS DAS ESPECIES BRASILEIRAS DO GENERO "SPONGOPHORUS" FAIRMAIRE

I — Processo pronotal anterior desprovido de um lobulo ou denticulo proximo á secção mediana da margem posterior.

Subg. *Cladonota* STAL

1 (6) Nodulo dorsal do processo pronotal posterior alargado no meio.
2 (5) Nodulo dorsal triangular.
3 (4) Nodulo dorsal abrangendo uma grande parte do processo pronotal posterior; angulo superior provido de um appendice dirigido para traz; margem lateral do mesmo processo levemente inclinada; secção apical do processo pronotal anterior, mais ou menos cylindrica, com apice truncado . . . . . *S. mirabilis* FAIRM.
4 (3) Nodulo dorsal abrangendo toda a extensão do processo pronotal posterior; appendice do angulo superior erecto, terminado em ponta bifida; margem anterior convexa; secção apical do processo pronotal anterior deprimida, com o apice arredondado . . . . . *S. atratus*, n. sp.
5 (2) Nodulo dorsal não triangular, cylindrico, espesso, localizado no centro do processo pronotal posterior; processo pronotal anterior um tanto adelgado para o apice, curvado para traz e tocando á extremidade do nodulo dorsal . . . . . *S. falleni* STAL
6 (1) Nodulo dorsal constricto proximo ao meio; processo pronotal anterior sinuado, mais ou menos dilatado na secção mediana.
7 (8) Secção mediana do processo pronotal anterior fortemente dilatada, foleacea e comprimida, tocando no noculo dorsal, nodulo dorsal trinodoso *S. foliatus* FUNKH.
8 (7) Secção mediana do processo pronotal anterior não foleacea, ligeiramente entumecida ou de uma só largura.
9 (14) Processo pronotal anterior tocando á extremidade do lobulo dorsal.
10 (11) Lobulo dorsal trinodoso . . . . . *S. cinereus* FONS.
11 (10) Lobulo dorsal binodoso.
12 (13) Extremidade do processo pronotal anterior entumecida, campanuliforme *S. rufescens* FONS.
13 (12) Extremidade do processo pronotal anterior afilada, truncada . . . . ♂ . . *S. undulatus* WALKER
14 (9) Processo pronotal anterior não tocando no lobulo dorsal.

15 (18) Nodulo dorsal, bilobado, dilatado.
16 (17) Extremidade no nodulo dorsal com 2 espinhos curtos e conicos . . . ♀. . *S. undulatus* WALKER
17 (16) Extremidade no nodulo dorsal sem espinhos . . . *S. ridiculus* WALKER
18 (15) Nodulo dorsal trilobado, lobulo mediano largo, fortemennte comprimido, provido de um pequeno bulbo tuberculiforme.
19 (20) Extremidade do processo pronotal anterior bifida *S. paradoxus* GERMAR

II — Processo pronotal anterior provido de um lobulo ou de um dentinho implantado proximo á secção mediana da margem posterior.

Subg. *Lobocladisca* STAL

1 (8) Processo pronotal anterior formando uma curvatura pronunciada a partir da secção mediana.
2 (3) Nodulo dorsal do processo pronotal posterior mais desenvolvido e mais longo do que o processo pronotal anterior, quasi erecto, dilatado na secção mediana, acuminado para a extremidade apical e implantado na secção mediana do processo pronotal; processo pronotal anterior delgado, quasi cylindrico, denticulo postmarginal implantado na secção mediana, duas vezes mais largo do que longo . . *S. guerinii* FAIRM.
3 (2) Nodulo dorsal do processo pronotal posterior muito mais curto do que o processo pronotal anterior.
4 (5) Nodulo dorsal do processo pronotal posterior sessil, comprido, convexo, dilatado na extremidade distal e implantado no apex do processo posterior; extremidade distal do processo pronotal anterior espatulada, não tocando no nodulo dorsal do processo pronotal posterior, excedendo o apex deste ultimo . . . . . *S. spatulatus* FAIRM.
5 (4) Nodulo dorsal do processo pronotal posterior constricto na secção mediana, não sessil.
6 (7) Lobulo postmarginal do processo pronotal anterior curto, conico, não tocando no lobulo dorsal do processo pronotal posterior clavifórme *S. biclavatus* WESTW.
7 (6) Lobulo postmarginal do processo pronotal anterior alongado, delgado, tocando no lobulo dorsal do processo pronotal posterior; extremidade distal do processo pronotal posterior cruciforme . . *S. clavarius* FAIRM.
8 (1) Processo pronotal anterior erecto, ligeiramente inclinado para a frente, comprimido, gradativamente aguçado a partir da secção mediana, com a extremidade distal ligeiramente recurvada; denticulo postmarginal obliquo, implantado na secção mediana do processo pronotal posterior, tão longo quanto o processo pronotal anterior, sensivelmente afilado para a extremidade apical . . . . . *S. lividus* BUCKT.

ABSTRACT

This paper is a contribuition to the knowledge of neotropical membracidae and deals with five new species.

COCCIDIOS DOS ANIMAES DOMESTICOS DO BRASIL

POR

V. L. Yakimoff

Trabalho do Instituto de Veterinaria de Leningrado

I — INTRODUCÇÃO

O estudo dos coccidios data de quasi cem annos quando HAKE, em 1836, encontrou em figado de coelho focos contendo oocystos desses protozoarios.

Durante algum tempo só se conheciam os coccidios de coelhos mas, em 1876 foi descoberto por ZÜRN um coccidio no gado bovino que RIVOLTA em 1878, como homenagem a ZÜRN, denominou *Eimeria zürnii*. Em 1878 GRASSI descreveu a *Isospora* de gatos *(Isospora rivolta)*. Depois, RAILLET e LUCET em 1891, descreveram coccidios de gallinhas *(Eimeria tenella)* e de gansos *(Eimeria truncata)*. No mesmo anno, STILES encontrou coccidios em cães e gatos *(Isospora bigemina)*. Em seguida, em 1901, MOUSSU e MAROTEL encontraram coccidios em ovelhas, e MAROTEL, em 1905, em cabras.

Durante dezeseis annos o estudo dos coccidios ficou estacionado, mas, depois da guerra mundial, resurgiu o interesse pelo estudo desses protozoarios.

Em 1921 DOUWES descreveu coccidios em suinos e, em seguida, por uma serie de autores foram encontrados coccidios em outros animaes domesticos.

Assim, simultaneamente, NOELLER e IVANOVA-GOBZEM em 1932, encontraram coccidios *(Eimeria camelli)* em camellos. WENYON, em 1923, descreveu a *Isospora* de gatos *(Isospora felis)* e a *Eimeria* de cães *(Eimeria canis)*, NIESCHULZ, em 1924, achou nos gatos a *Eimeria felina*, YAKIMOFF em 1933, nos mesmos animaes, a *Eimeria cati*, GUSSIEV, em 1934, nos ungulados, YAKIMOFF, em 1935, no veado do Norte. Durante esse tempo muitos outros autores encontraram, nos animaes domesticos, novos coccidios, além dos já descriptos (Miss D. HENRY, 1931, nos porcos; TYZZER, 1929, nas aves domesticas; JOHNSTON, 1930, nas gallinhas; YAKIMOFF e RASTEGAEFF, 1908, nas cabras e ovelhas; YAKIMOFF e GALUZZO, 1927, no gado bovino; YAKIMOFF, 1934, no mesmo gado; BECKER e FRYE, 1929, no mesmo gado, TUBANGUI, 1931, no mesmo gado etc.). Si addicionarmos a esses os coccidios encontrados nos animaes de longo pello e os selvagens, na maior parte dos jardins zoologicos, (GALLI VALERIO na Suissa, WEIDMAN, MARTIN, ANDREWS

e D. HENRY nos Estados Unidos, TRIFFIT na Inglaterra, SPREHN na Allemanha, PINTO e CARINI no Brasil, YAKIMOFF e collaboradores na União Sovietica etc.), verificar-se-á que, no momento actual, o estudo dos coccidios e das molestias provocadas por elles, desenvolveu-se de tal modo que tornou-se conveniente, além dos artigos nas revistas, imprimir livros especiaes (como, por exemplo, a monographia de BECKER, 1934). Muitos paizes foram attrahidos pelo estudo dos coccidios e das coccidioses.

Na Europa: Suissa, França, Allemanha, Hollanda, Inglaterra, Hungria, Polonia e U. R. S. S.

Na Asia: India, Japão, China, Ilhas de Java e Formosa.

Na Africa: Marrocos, Tunis, Eritréa, Africa do Sul, Africa oriental ingleza e Africa occidental franceza.

Na America: Estados Unidos, Canadá, Honduras e Brasil.

No Brasil conhecemos somente dois trabalhos sobre coccidioses dos animaes domesticos: PENHA, sobre *Eimeria zürnii* do gado bovino e PENHA e PACHECO sobre a *Eimeria faurei* de cabras.

Occupando-me durante 10 annos com o estudo das coccidioses dos animaes domesticos, interessei-me pelos coccidios de outros paizes. Tendo terminado o estudo de coccidios do gado bovino da Suissa, pedi a J. MACIEL me enviasse fezes dos animaes domesticos do Brasil.

Delle recebi material de gado bovino, porcos, ovelhas e gallinhas, pelo que muito lhe agradeço.

Neste artigo occupo-me com os resultados das pesquisas sobre os coccidios dos animaes domesticos do Brasil.

O material recebido do Brasil, apesar da distancia, chegou-me em boas condições. Acondicionado em tubos com rolhas de cortiça parafinada, o material conservou-se fresco e os coccidios não se alteraram.

Chegando a Leningrado, o material foi submettido ao processo de enriquecimento de DARLING. Para facilitar a esporulação dos cystos, o material foi posto em soluto de bichromato de potassio a 2 %.

II — GADO BOVINO

O primeiro caso de coccidiose do gado bovino foi assignalado por ZÜRN, 1866, num bezerro cujos organs foram-lhe enviados de Borna (Saxonia). ZÜRN encontrou nelles «hemogregarinas». RIVOLTA, 1878, denominou esse parasito *Cystospermium zürnii*.

Mais tarde, diversos autores suissos (ZSCHOKKE, 1892, e, independente delle, GUILLEBEAU, 1893, HESS, 1892, depois, ZÜBLIN, 1908 e outros, observaram essa coccidiose em varios cantões da Suissa.

Em seguida, molestias produzidas por coccidios foram descriptas em outros paizes (França, Allemanha, Inglaterra, Italia, Hollanda, Tunis, Africa Oriental Britannica, Sudan, India, Japão, Ilhas Filippinas, Estados Unidos da America do Norte, Honduras e U. R. S. S.

Mas, até 1925, os coccidios encontrados no gado bovino foram descriptos sob o nome de *Eimeria zürnii*. Em 1918, os scientistas americanos Th. Smith e Graybiel no seu trabalho sobre coccidiose desses animaes, examinando os coccidios encontrados, formularam a supposição de que nesses animaes existem duas formas, uma redonda, que depois da esporulação não tem corpos residuaes nos esporocystos, e outra oval, que tem corpos residuaes nos esporocystos. Em 1925, Yakimoff e Galuzo que acharam pela primeira vez o coccidiose no gado bovino da Russia, descreveram duas formas dos coccidios encontrados por elles: uma redonda, para a qual propuzeram conservar a denominação classica de *Eimeria zürnii* e outra, oval, á qual denominaram, em homenagem a Th. Smith, *Eimeria smithi*. Em 1928, dois autores americanos, Becker e Frye, descreveram nos EE. UU. um coccidio novo, denominado por elles *Eimeria ellipsoidalis* que distinguem da *E. smithi*. Em 1931, Tubangui, nas Ilhas Filippinas, descreveu um novo coccidio cujo oocysto se distingue dos conhecidos coccidios do gado bovino pelo grande tamanho e côr castanho-parda *(Eimeria bukidnonensis)*. No mesmo anno, Wilson, nos EE. UU. descreveu o coccidio *Eimeria cylindrica*. Em 1934, Yakimoff, descreveu em Azeidardjan (U. R. S. S., Transcaucasia) mais dois novos coccidios, *Eimeria zurnabadensis* e *Eimeria azerbaidschanica*. Em 1935, Gveleciani, na Georgia (Transcaucasia) descreveu um novo coccidio que denominou *Eimeria thianeti*. Yakimoff nega individualidade a este coccidio.

Deste modo, existem actualmente os seguintes coccidios do gado bovino: 1) *E. zürnii,* 2) *E. smithi,* 3) *E. ellipsoidalis,* 4) *E. bukidnonensis,* 5) *E. cylindrica,* 6) *E. zurnabadensis* e 7) *E. azerbaidschanica.*

A coccidiose do gado bovino produz nesses animaes, principalmente nos novos, colite hemorragica ou curso sanguineo.

No Brasil, até agora, existem poucos trabalhos sobre coccidiose do gado bovino. Conhecemos somente um trabalho do Dr. A. Penha.

Do Brasil recebemos fezes de 49 exemplares de gado bovino que foram recolhidos no Matadouro de Osasco (nos arredores de S. Paulo). Em doze dellas, isto é, 24,4 %, existiam coccidios de tres especies: *E. smithi, E. ellipsoidalis* e *E. bukidnonensis*. Esses coccidios encontram-se nas fezes associados ou não, como se vê na tabella I.

TABELLA I

	E. smithi	E. ellipsoidalis	E. bukidnonensis	E. smithi + E. ellipsoidalis
Numero total dos infestados . . .	8	1	1	2
Porcentagem em relação ao numero total dos animaes pesquisados. .	16,3	2	2	4
Porcentagem em relação ao numero total dos animaes infestados . .	66,6	8,2	8,3	16,6

Nesta tabella vê-se que mais frequentemente se encontra a *E. smithi.*

1. *Eimeria smithi* Yakimoff e Galuzo, 1927

Infestações puras por este coccidio foram encontradas em 8 dos 49 casos examinados (16,3 % do total dos animaes pesquisados, e 66,6 do total dos infestados) e, em dois animaes, associados a outros coccidios (porcentagens correspondentes: 4,0 e 16,6). Portanto, a *E. smithi* foi encontrada em 10 animaes (porcentagens correspondentes: 20,4 e 83,3).

Os oocystos eram ovaes e amarellados. Raros exemplares tinham micropyla. Envoltorio de duplo contorno. As dimensões dos oocystos (foram medidos 117 exemplares) figuram na tabella II.

TABELLA II — *Eimeria smithi*

	30,6	32,4	34,2	36	37,8	39,6	41,4	43,2	45	Total
19,8	1 (0,64)									1
23,4			1 (0,68)	6 (0,65)		3 (0,59)		1 (0,54)	1 (0,53)	12
25,2		1 (0,72)	1 (0,72)	8 (0,70)	3 (0,66)	11 (0,63)	7 (0,61)	9 (0,58)	3 (0,56)	43
27,0				3 (0,75)	3 (0,71)	20 (0,68)	7 (0,65)	15 (0,62)	7 (0,60)	55
28,8				1 (0,80)			1 (0,69)	3 (10,68)		5
30,6						1 (0,77)				1
Total	1	1	2	18	6	35	15	28	11	117

Nota — Os numeros entre parenthesis são os indices de dimensões e os que estão fora representam a quantidade dos oocystos medidos.

Nesta tabella vemos que o tamanho da *E. smithi* é igual a 30,6-45,0 μ × 19,8-30,6 μ, em média 40,3 μ × 25,5 μ; o maior tamanho é 45,0 μ × 27,0 μ; o menor tamanho é 30,60 μ × 19,8 μ. Os tamanhos mais frequentes são: 39,6 μ × 27,0 μ. Indice: 1:0,35-0,80, em média, 1:0,64; os mais frequentes são 1:0,68.

Os oocystos encontrados nas fezes enviadas do Brasil chegaram immaturos. As fezes foram postas em soluto a 2 % de bichromato de potassio e, depois de alguns dias, desenvolveram-se em cada oocysto quatro esporos e, em cada esporo, dois esporozoitos. Os esporos eram alongados ou piriformes.

Os oocystos não tinham corpos residuaes mas os esporocystos os tinham (Yakimoff e Ivanova-Gobzem viram, em 1935, uma vez, corpo residual no oocysto).

Devemos dizer que na U. R. S. S. não raro encontramos este oocysto com mui reduzidas dimensões em alguns animaes (desde 18-30 μ de comprimento) emquanto que em outros animaes elle tinha as dimensões constantes da tabella II, porém, ás vezes, encontramos infestação com oocystos pequenos e grandes. Não os consideramos como especies differentes.

2. *Eimeria ellipsoidalis* Becker e Frye, 1929.

Num caso, havia infestação somente por este coccidio (2 % dos animaes examinados, 8,3 % em relação ao numero de infestações) e, em dois casos, associado a outros coccidios (porcentagens correspondentes: 4 e 16,6). Este coccidio foi pois, encontrado em tres animaes (porcentagens correspondentes 6,1 e 24,9).

Os oocystos são ellypticos e, quando frescos, roseos.

Não têm micropyla e o envolucro é de duplo contorno.

Dimensões: 23,4 μ - 28,8 μ × 19,8 μ - 23,4 μ. Não damos média porque eram escassos os oocystos. Indice da forma: 1:0,73-0,85.

Postos em soluto a 2 % de bichromato de potassio, os oocystos deram quatro esporos alongados, cada esporo com dois esporozoitos. Somente os esporocystos continham corpos residuaes.

3. *Eimeria bukidnonensis* Tubangui, 1931.

Num unico caso havia infestação somente por este coccidio (2 % em relação ao total das amostras examinadas e 8,3 % do total do material infestado).

Formas rigorosamente piriformes, sem estrangulamento, de côr parda, com micropyla. Envoltorio de tres contornos.

Dimensões: 46,8 μ × 34,2 μ. Indice da forma: 1:0,73.

Em soluto de bichromato de potassio a 2 % desenvolveram-se quatro esporos de forma de limão alongado, de tamanho 14-21 $\mu \times$ 9-12μ com dois esporozoitos em cada esporo. Os oocystos não têm corpos residuaes que só existem nos esporocystos (contra a opinião de TUBANGUI).

Parece que este coccidio tem grande distribuição geographica. Encontrado pela primeira vez por TUBANGUI nas Ilhas Filippinas em 1931, foi elle assignalado, um mez depois, em Uzbekistan (Asia Central) por YAKIMOFF, GUSSIEFF e RASTEGAEFF, em 1931 e, em seguida, por YAKIMOFF, em muitos logares da U. R. S. S., até mesmo bem ao norte (por exemplo, na Russia Branca). Na Suissa elle não foi encontrado por nenhum pesquisador e até ás pesquisas de YAKIMOFF em 1935, não o acharam.

Vemos, deste modo, que no gado bovino do Brasil (pelo menos nas zonas de onde procedia o material que recebemos) existem somente tres especiaes, isto é, *E. smithi, E. ellipsoidalis* e *E. bukidnonensis*.

Com grande admiração nossa, não encontramos um coccidio muito frequente em toda parte e que PENHA observou no Brasil, isto é, *E. zürnii*.

Julgamos que essa especie de coccidio é a causa mais frequente da colite hemorrhagica dos bovinos (principalmente bezerros). Tambem não encontramos a *E. cylindrica* cuja existencia foi constatada nos EE. UU. por WILSON e, em seguida, na U. R. S. S., em 1932. Além disso, na U. R. S. S., YAKIMOFF descreveu dois coccidios raramente encontrados: *E. azerbaijanica* e *E. zurnabadensis*.

Si nos lembrarmos da porcentagem de infestação do gado bovino nos varios paizes, veremos o seguinte: ZSCHOKK, 1890, diz não ter encontrado coccidios em animaes sãos ou convalescentes. ZÜBLIN, 1908, examinou fezes e a mucosa de nove animaes mortos (tres de 2 annos, tres de 4 annos e tres de mais de 4 annos) com resultados negativos; examinou tambem com resultado negativo alguns animaes apparentemente sãos mas que estiveram juntos com os doentes. Em duas vaccas abatidas por soffrerem de strongylidiose intestinal não foram encontrados coccidios. Este facto permittiu ao autor referido proclamar que o intestino normal dos animaes não tem coccidios, que se encontram em numero maior ou menor, nos casos de curso hemorrhagico. Porém, pesquisas ulteriores provaram que no intestino dos animaes considerados sãos pode existir coccidios.

Assim, GUILLEBEAU, 1893, encontrou coccidios em animaes que não tinham signal de dysenteria. STORCH, 1904, foi o primeiro que observou coccidios em animaes sãos. VELU, 1919, em Marrocos, des-

creveu a coccidiose latente do gado. MUELLER, 1914, no matadouro de Kiel, em 42 animaes examinados, encontrou 88 % infestados. CREDIET, 1928, examinou no matadouro de Utrecht 50 animaes dos quaes 70 % estavam infestados por coccidiose. NOELLER e FRENZ, 1922, no matadouro de Berlim, de doze bezerros encontraram sete parasitados e de dezeseis vaccas, tres com coccidios. OTTEN, 1922, examinou 100 bezerros dos quaes 54 tinham coccidios e 100 vaccas das quaes 22 tambem tinham esse parasito. V. NEDERVEEN, 1922, em Leiden, examinou sete animaes apparentemente sãos dos quaes dois estavam parasitados. YAKIMOFF e GALUZO, 1925, examinaram na U. R. S. S. (região de Leningrado) 1.208 cabeças de gado das quaes 28 estavam muito infestadas e 209 fracamente infestadas. YAKIMOFF, GUSSIEFF e RASTEGAEFF, 1932, examinaram em Uzbekistan 126 cabeças das quaes 54,7 % estavam infestadas. YAKIMOFF, 1931, viu em Azerbaidjan, em 41 animaes examinados, 53,6 % infestados.

III — CARNEIROS

Foi RIVOLTA quem primeiro referiu a existencia de coccidios em carneiros, 1874. STILES, em 1892, descreveu manchas brancas na mucosa do intestino delgado de carneiros contendo oocystos de coccidios que elle identificou á *E. perforans,* do coelho. Depois, sobre coccidios de carneiros referem-se nos EE. UU., CURTICE 1892, na Inglaterra, M'FADYEAN 1896 e na Italia, MAZZANTI 1900. Porém, foram MOUSSU e MAROTEL, 1901, os que na França primeiro descreveram coccidios de carneiro. Depois delles foram descriptos coccidios nos demais paizes (Hollanda, Allemanha, Hungria, Tunis, Marrocos, Africa do Sul, India, Ilhas de Java e U. R. S. S.). Cinco annos depois da descripção de coccidios de carneiros, MAROTEL descreveu coccidios de cabras. Em outros paizes, foram encontrados e descriptos coccidios nesses animaes (Hollanda, Allemanha, Hungria, Sudan, Tunis, Marrocos, Africa Franceza Occidental, Africa do Sul, EE. UU., Japão, India e U. R. S. S.).

Desde a descoberta dos primeiros coccidios de carneiros houve grande confusão que durou até 1932. O coccidio de carneiro, *E. faurei,* descripto por MOUSSU e MAROTEL em 1901, foi identificado por uma serie de autores ao coccidio da cabra, *E. arloingi,* descripto por MAROTEL em 1905.

MOUSSU e MAROTEL, 1901, descreveram em carneiro com o nome de *E. faurei* um oocysto oval com micropyla mas sem operculo; MAROTEL, 1905, descreveu em cabras um oocysto oval com micropyla e operculo. Em outras palavras, começaram a descrever a *E. faurei* com operculo. Nesse erro incorreu uma serie de pesquisadores como

REICHENOW, NOELLER, YAKIMOFF e outros, affirmando existir nos carneiros e cabras dois coccidios, embora morphologicamente semelhantes e providos de operculo. E' verdade que anteriormente alguns autores suspeitaram a identidade desses dois coccidios. Assim, NOELLER, SCHURJOHANN e VORBRODT, 1922, fizeram a infestação cruzada de carneiros e cabras com esses coccidios e tentaram identifical-os. BALOZET, 1932, occupou-se seriamente dessa questão, reviu toda litteratura e, por fim, chegou á conclusão que durante trinta annos perdurou o erro e que na verdade *E. faurei,* descripta por MOUSSU e MAROTEL, 1901, não tem operculo emquanto *E. arloingi* o possue.

Em 1929 YAKIMOFF e RASTEGAEFF encontraram em cabra dois novos coccidios, *E. ninae-kohl-yakimovi* e *E. galousoi,* os quaes foram depois encontrados em carneiro. No mesmo anno, KOTIA, MOCSY e VAJDA descreveram mais uma especie, *E. parva.*

A *E. aemula,* descripta por YAKIMOFF em 1931, depois da contestação de BALOZET, cahiu em synonimia com *E. faurei* por se assemelhar muito a esta ultima.

Sendo parasitados pelos mesmos coccidios *(E. faurei, E. arloingi, E. minae-kohl-yakimovi, E. galouzoi* e *E. parva)* os carneiros e cabras soffrem das mesmas molestias.

Tanto nos carneiros e cabras como no gado bovino, a coccidiose é molestia dos animaes jovens.

No Brasil conhecemos somente um trabalho sobre coccidiose de cabras, de PENHA e PACHECO.

Recebemos fezes de 49 carneiros recolhidas em pequenas criações do Municipio de Itapecerica, perto de S. Paulo e destas, 24 continham coccidios (48,9 %).

Encontramos quatro especies: *E. arloingi, E. ninae-kohl-yakimovi, E. intricata* e *E. galouzoi.*

A infestação por essas especies vê-se na tabella 3.

TABELLA 3

	Eimeria arloingi	*Eimeria ninae-kohl-Yakimovi*	*Eimeria galouzoi*	*E. arloingi* + *E. ninae-kohl-Yakimovi*	*E. arloingi* + *E. galouzoi*	*E. ninae-kohl-Yakimovi* + *E. intricata.*	*E. ninae-kohl-Yakimovi* + *E. galouzoi.*	*E. arloingi* + *E. ninae-kohl-Yakimovi* + *E. galouzoi.*
Total dos infestados	4	5	1	6	1	1	3	3
Porcentagem em relação ao total dos animaes examinados	8,1	10,2	2,0	12,2	2,0	2,0	6,1	6,1
Porcentagem em relação ao total dos animaes infestados.	16,6	20,8	4,1	25,0	4,1	4,1	12,5	12,5

1. *Eimeria arloingi* Marotel, 1905.

Quatro dos animaes estavam infestados somente com este coccidio. (8,1 % em relação do total dos examinados e 16,6 % em relação ao total dos infestados) e 10 em associação com outros coccidios (porcentagens correspondentes: 20,4 e 41,6). Eram 13 ao todo os carneiros infestados por esse coccidio (porcentagens correspondentes: 26,5 e 54,2). Os oocystos eram ovaes ou ligeiramente oblongos, providos de micropyla com operculo e amarellados. Envoltorio de duplo contorno. As dimensões vêm-se na tabella 4 (foram medidos 65 oocystos).

TABELLA 4 — *E. arloingi*

	25,2	27,0	28,8	30,6	32,4	34,2	36,0	37,8	39,6	Total
19,8	2 (0,78)		3 (0,68)	4 (0,64)	2 (0,61)					11
21,6		1 (0,80)	8 (0,74)	11 (0,70)	12 (0,66)					32
23,4				6 (0,76)	6 (0,72)	3 (0,68)		2 (0,62)		17
25,2							2 (0,70)	2 (0,67)		4
26,1									1 (0,65)	1
Total	2	1	11	21	20	3	2	4	1	65

Nota — Os numeros entre parenthesis indicam os indices da forma e os que estão fóra, a quantidade de oocystos medidos.

Vemos nesta tabella que as dimensões dos oocystos são 25,2-39,6 μ × 19,8-22,3 μ, média 31,2 μ × 22,3 μ, os maiores 39,6 μ × 26,1 μ, os menores 25,2 μ × 19,8 μ, os mais frequentes, 32,4 μ × 21,6 μ. Indice: 1:0,61-0,80; média 1:0,65; os mais frequentes: 1:0,70.

Em soluto de bichromato de potassio a 2 %, os oocystos deram cada um com 2 esporozoitos em cada esporo.

Esporulados, os oocystos não apresentam corpos residuaes (que só existem nos esporocystos) nem granulação polar.

Eimeria ninae-kolh-Yakimovi Yakimoff e Rastegaeff, 1929.

Cinco dos animaes estavam infestados somente com este coccidio (10,2 % em relação ao total dos animaes examinados e 20,8 % em relação ao total dos infestados) a treze em associações com outros coccidios (porcentagens correspondentes: 26,5 e 54,1). Eram 18 ao todo os carneiros infestados por este coccidio (porcentagens correspondentes: 36,7 % e 75,0 %. Os oocystos eram rigorosamente ovaes,

sem micropyla, amarellados. Envoltorio liso, de duplo contorno. As dimensões dos oocystos vêm-se na tabella 5 (foram medidos 35 exemplares).

TABELLA 5 — *Eimeria minae-kohl-yakimovi*

	23,4	25,2	26,1	27,0	28,8	30,6	Total
18,0	1 (0,77)						1
19,8		2 (0,78)		5 (0,73)	1 (0,68)		8
21,6		6 (0,85)	1 (0,82)	2 (0,80)	8 (0,74)		17
23,4		1 (0,92)		1 (0,85)	6 (0,84)	1 (0,76)	9
Total	1	9	1	8	15	1	35

Nota — Os numeros entre parenthesis indicam os indices e os que estão fóra, a quantidade de oocystos medidos.

Vemos nesta tabella que os oocystos deste coccidio têm dimensões de 23,4-30,6 × 18,0-23,4 μ em média, 27,28 μ × 21,50 μ; os maiores 30,6 μ × 23,4 μ; os menores 23,4 μ × 18,0 μ; os mais frequentes, 28,8 μ × 21,6 μ. Indice da forma: 1:0,68-0,92; média 1:0,79; os mais frequentes, 1:0,74.

Em soluto a 2 % de bichromato de potassio os oocystos deram quatro esporos com dois esporozoitos em cada um. Nos oocystos não existem corpos residuaes nem granulação polar. Corpos residuaes existem somente nos esporocystos.

3. *Eimeria intricata* Spiegl, 1925.

Os oocystos deste coccidio são os maiores conhecidos de cabras e carneiros.

No material enviado não existia parasitismo puro por este coccidio. Encontramos somente um caso em que este parasito estava associado a outros coccidios (em relação ao total dos animaes examinados 2 % e, em relação ao total dos animaes infestados, 4,1 %). Nesse animal existia insignificante quantidade desses oocystos.

Cystos ovaes com micropyla ou estrangulamento aberto num dos polos. Envoltorios de tres contornos com faixas estreitas radialmente dispostas. De côr escura, pardo-castanho. Dimensões de alguns oocystos: 52,2-52,7 μ × 39,6-46,5 μ.

Não tentamos cultura por ser exigua a quantidade desses oocystos. Porém, os autores que estudaram esse coccidio (Spiegl, na Allemanha, 1925, e Yakimoff com collaboradores na U. R. S. S.) consta-

taram que nelles se desenvolvem quatro esporos com dois esporozoitos em cada um. Nos oocystos não existem corpos residuaes nem granulação polar. Os esporocystos contem corpos residuaes.

4. *Eimeria galouzoi* YAKIMOFF e RASTEGAEFF, 1929.

Um dos casos estava infestado somente por este coccidio (em relação ao total dos animaes examinados 2,0 % e, em relação ao total dos animaes infestados, 4,1 %) e em sete outros casos elle estava associado a outros coccidios (porcentagens correspondentes: 14,3 % e 29,1 %. Ao todo, estavam infestados por este coccidio oito animaes (porcentagens correspondentes: 16,3 % e 33,3 %).

Oocystos redondos, com membrana lisa, de duplo contorno. Dimensões: 19,8-28-8 μ, média 22,6 μ. BALOZET, 1932, identificou este coccidio á *E. ninae-kohl-yakimovi.*

Do que precede vemos que, nos carneiros do Brasil está largamente disseminada a *E. ninae-kohl-yakimovi.* A *E. arlongi* foi constatada em 14 casos e a *E. galouzoi* em 8. Nem a *E. faurei* nem a *E. parva* foram observadas.

Nos paizes onde foram feitas identicas pesquisas a porcentagem de infestação é a seguinte: 69 % em Berlim, OTTEN, 1922; 44 % em carneiros e 86 % nos cordeiros, Allemanha, KITT, 1920; 80 % nos carneiros, Allemanha, BUSSE, 1923; 80 % na Hollanda, KREDIET, 1921. YAKIMOFF e collaboradores: no districto de Leningrado, em cordeiros, 65,5 %, em carneiros novos 67 % e nos adultos, velhos, 65,5 % em Erivan (Transcaucasia) 33,3 %; em Azerbaidjan (Transcaucasia) 100 %; em Dauria (Siberia) 100,0 %; na região central da Terra Preta, 98,4 %; SASUKHIN, 1930, na região do Ural, 87 %.

IV — PORCOS

O primeiro autor que fez referencias á coccidiose dos porcos foi RIVOLTA, em 1874. Elle descreveu o parasito encontrado por ZÜRN num leitão morto de enterite numa granja onde foram observadas repetidas epizootias. Depois, JOHNE, 1882, descreveu uma coccidiose hepatica nos leitões. PERRONCITO, 1902, descreveu numa forma grave de enterite, como coccidio, um *Blastocystis.* O primeiro que, de facto, viu coccidios nos porcos foi DOUWES, 1921, na Hollanda. No mesmo anno, acharam-no NOELLER, na Allemanha, e CAUCHEMEZ, na França, que desconheciam o trabalho de DOUWES.

DOUWES denominou o coccidio por elle encontrado *Eimeria debliecki,* NOELLER, *Eimeria suis* e CAUCHEMEZ, *Eimeria brumpti.* NIESCHULZ, 1922, estudando esta questão chegou á conclusão de que a prioridade deve caber a DOUWES, isto é, á denominação *E. debliecki.*

Em seguida, a coccidiose dos porcos foi descripta na Allemanha (Noeller e Frenz, 1923, Eichman e Soenteg, 1923, na Hollanda (Munnik, 1924, Graaf, 1925) na Ilha de Java (Nieschulz e Ponto, 1927) nos EE. UU. (Davis e Reich, 1924) na U. R. S. S. (Tsion e Chtchemikoff, 1923, Yakimoff e collaboradores, 1924, 25, 26). Em 1931, Miss D. Henry fez uma revisão dos coccidios de porcos e chegou á conclusão que nesses animaes existem quatro coccidios, isto é, *E. debliecki, E. scabra, E. spinosa* e *E. perminuta,* que se distinguem morphologicamente e pelas dimensões.

No Brasil, como sabemos, ninguem se occupou com coccidios de porcos.

Examinamos 53 fezes recolhidas na matadouro de Osasco e, destas, 45 continham coccidios (84,9 %). Encontramos tres coccidios: *E. debliecki, E. scabra, E. perminuta.* Os coccidios se achavam sós ou associados, como se vê na tabella 6.

TABELLA 6

	Eimeria debliecki	*Eimeria perminuta*	*E debliecki + E. perminuta + E. scabra*	*E. scabra + E. debliecki*	*E. debliecki + E. perminuta.*
Total dos animaes infestados	14	2	17	7	5
Porcentagem em relação ao total dos animaes examinados	28,5	4,0	34,6	14,3	10,2
Porcentagem em relação ao total dos animaes infestados	31,1	4,4	37,7	15,5	11,1

Vemos nesta tabella que a mais frequente é a *E. debliecki.*

1. *Eimeria debliecki* Douwes, 1921.

Em 14 dos casos examinados encontramos somente *E. debliecki* (26,6 % em relação ao total dos animaes examinados e 31,1 % em relação ao total dos infestados) e em 29 esse coccidio se achava associados a outros (porcentagens correspondentes: 54,7 % e 64,4 %). Ao todo, esse coccidio foi encontrado em 43 porcos (porcentagens correspondentes: 81,1 % e 95,5 %).

Os oocystos são ovaes, transparentes, sem micropyla, com capsula de duplo contorno, de espessura 1,2 μ. As dimensões (foram medidos 103 oocystos vêm-se na tabella 7.

TABELLA 7 — *Eimeria debliecki*

	17,1	18,0	19,8	20,7	21,6	23,4	24,3	27,0	Total
12,6		3 (0,70)	6 (0,60)						9
13,5	1 (0,70)	1 (0,75)							2
14,4		21 (0,80)	28 (0,72)	4 (0,68)	3 (0,67)		1 (0,59)		57
16,2		6 (0,90)	15 (0,81)	2 (0,78)	4 (0,74)	2 (0,69)		1 (0,60)	30
17,1				1 (0,82)			1 (0,70)		2
18,0						1 (0,77)	1 (0,73)		2
19,8								1 (0,73)	1
Total	1	31	49	7	7	3	3	2	103

Nota: Os numeros entre parenthesis são indices da forma e os que estão fóra representam a quantidade dos oocystos medidos.

Vemos nesta tabella que as dimensões dos oocystos são de 17,7-27,0 μ × 12,6-19,8 μ, média 19,7 μ × 14,9 μ, os maiores 27,0 × 19,8 μ, os menores 17,7 μ × 13,5 μ, os mais frequentes 19,8 μ × 14,4 μ. Indice da forma: 1:0,59-0,90, em média 1:0,54, os mais frequentes, 1:0,72.

No soluto a 2 % de bichromato de potassio desenvolveram-se em cada oocysto quatro esporos, cada um com dois esporozoitos. Os oocystos não têm corpos residuaes que só se encontram nos esporocystos. Existe granulação polar nos oocystos.

2. *Eimeria scabra* Henry, 1931.

Das 53 fezes examinadas, vinte e quatro continham este coccidio (45,3 % em relação ao total dos animaes examinados e 53,3 % em relação ao total dos animaes infestados). Este coccidio não foi encontrado nenhuma vez só, mas sempre associado a outros.

Os oocystos eram escuros, ovaes, oblongos e raramente cylindricos, redondos ou sub-esphericos e desprovidos de micropyla. Capsula espessa (1,5-1,8 μ), lisa, sem desenhos radiaes, de duplo contorno.

As dimensões dos oocystos (exclusive os redondos) vêm-se na tabella 8 (foram medidos 78 oocystos).

TABELLA 8 — *Eimeria scabra* — Formas ovaes

	25,2	27,0	28,8	30,6	32,4	35,1	36,0	Total
18,0			1 (0,62)					1
19,8	1 (0,78)	1 (0,73)	3 (0,68)	1 (0,64)		2 (0,56)		8
21,6		3 (0,80)	5 (0,74)	4 (0,70)	3 (0,66)			15
23,4		11 (0,86)	12 (0,81)	13 (0,76)	2 (0,72)			38
24,3			4 (0,84)					4
25,2			2 (0,87)	6 (0,82)	1 (0,77)		1 (0,70)	10
27,9				2 (0,91)				2
Total	1	15	27	26	6	2	1	78

Nota: Os numeros entre parenthesis são os indices da forma e os que estão fóra representam a quantidade de oocystos medidos.

Vemos nesta tabella que as dimensões dos oocystos são de 25,2-36,0 μ × 18,0-27,9 μ, média 29,5 μ × 23,0 μ, os maiores 36,0 μ × 25,2 μ, os menores 25,2 μ × 19,8 μ, os mais frequentes 30,6 μ × 23,4 μ.

Indice da forma: 1:0,56-0,91; média 1:0,78; os mais frequentes, 1:0,76.

As dimensões das formas redondas (foram medidas 13 oocystos) vêm-se na tabella 9.

TABELLA 9 — *Eimeria scabra* — Formas redondas

Dimensões	21,6	23,4	24,3	25,2	30,6	Total
Quantidade	3	6	1	2	1	13

As dimensões das formas sub-esphericas são de 25,2-28,8 μ × 23,4-27,0 μ. Indice da forma: 1:0,90-0,93.

Em soluto a 2 % de bichromato de potassio desenvolveram-se em cada oocysto quatro esporos e em cada esporo dois esporozoitos.

Oocystos sem corpos residuaes e com granulação polar.

Esporocystos com corpos residuaes.

3. *Eimeria perminuta* Henry, 1931.

Das fezes examinadas, vinte e quatro continham este coccidio (45,3 % em relação ao total dos animaes examinados e 53,3 % em relação ao total dos animaes infestados). Sosinho, este coccidio foi encontrado em duas amostras de fezes (porcentagens correspondentes: 3,7 e 4,4) e, associado a outros coccidios, em vinte e duas amostras (porcentagens correspondentes: 41,5 e 48,8).

Oocystos ovaes ou redondos, transparentes, sem micropyla, capsula de duplo contorno. As dimensões dos ovaes (foram medidos 50 oocystos) vêm-se na tabella 10.

TABELLA 10 — *Eimeria perminuta* — Formas ovaes

	14,4	16,8	17,1	18,0	Total
10,8	1 (0,75)	2 (0,66)			3
12,6	3 (0,87)	12 (0,67)	1 (0,73)	11 (0,70)	27
13,5				1 (0,75)	1
14,4		3 (0,88)		16 (0,80)	19
Total	4	17	1	28	50

Nota: Os numeros entre parenthesis são os indices da forma e os que estão fóra representam a quantidade de oocystos medidos

Vemos nesta tabella que as dimensões são de 14,4-18,0 μ × 10,8-14,4 μ, média 17,1 μ × 13,2 μ, os maiores, que são os mais frequentes, 18,0 μ × 14,4 μ, os menores 14,4 μ × 10,8 μ. Indices da forma: 1:0,66-0,88; média 1:0,74; mais frequentes 1:0,80.

As dimensões das formas redondas, vejam na tabella 11.

TABELLA 11 — *Eimeria perminuta* — Formas redondas

Dimensões	12,6	14,4	16,2	18,0	Total
Quantidade	2	7	1	1	11

Em soluto a 2 % de bichromato de potassio, os oocystos esporularam e deram cada um quatro esporocystos e cada esporocysto dois esporozoitos.

Como vimos, não encontramos a quarta especie de coccidio de porco — *Eimeria spinosa.*

Foi Miss D. Henry quem primeiro viu esta especie de *Eimeria* em 1931, nos EE. UU. Yakimoff e seus collaboradores, estudando coccidios de porcos da U. R. S. S. (Leningrado, Russia Branca, Região de Ivanovo-Voznecensk e Azerbaidjan) tambem não encontraram este coccidio. Somente Martchenko, em 1934, constatou-o no Caucaso do Norte. Provavelmente este coccidio é muito raro.

A frequencia da coccidiose dos porcos observada por varios autores nos outros paizes é a seguinte: Noeller, em Hamburgo 10,6 %, Frenz, em Berlim, 73,4 %, Otten, em Berlim, 65 %, Noeller e Otten, em Berlim, 73,9 %, Minnik, Nienweerker, na Hollanda, 5,8%, Krediet, em Leiden (Hollanda) 22,0 %, de Graaf, em Leiden (Hollanda) 85,0 %. Cauchemez, em Paris, 26,0 %, Nieschulz e Ponto, na Ilha de Java, 100 %, Miss D. Henry, nos EE. UU. 30 %.

V. — GALLINHAS

A primeira descripção de coccidiose das gallinhas foi feita por A. Raillet e Lucet, em 1891. Denominaram o parasito por elles descripto *Eimeria tenella* e até 1928 elle foi por todos considerado não sómente o unico causador da coccidiose das gallinhas mas tambem tido como capaz de parasitar outras aves domesticas (patos, perús e faizães).

Somente em 1928 Tizzer, nos EE. UU., fez cuidadosas pesquisas sobre coccidios de gallinhas e verificou que essas aves são parasitadas por quatro coccidios que se localisam em varias porções do intestino e produzem molestias de grao e caracter differente: 1) *E. tenella* que se localisa nos cecos, produz uma molestia aguda; 2) *E. acervulina* que se localisa na primeira metade do intestino e muito raramente na parte inicial dos cecos, produz molestia chronica; 3) *E. maxima* que se localisa principalmente na parte média do intestino e mais raramente na primeira porção desse orgam mas não é encontrada nos cecos. E' pouco pathogenica mas pode tornar-se virulenta em presença de outras especies; 4) *E. mitis* que se localisa na parte anterior do intestino, raramente em ponto mais afastado, sendo muito rara nos cecos. E' pouco pathogenica. Tyzzer verificou que os perús e os faizães têm coccidios proprios — *E. meleagridis* e *E. meleagrimitis* nos primeiros e *E. phasiani* nos segundos.

Todos estes coccidios foram depois encontrados por Yakimoff e collaboradores na U. R. S. S. Johnston, 1930, nos EE. UU., encontrou nas gallinhas um coccidio por elle denominado *E. praecox* e, em seguida, outro — *E. necatrix.* Estes dois coccidios foram depois encontrados por Tyzzer.

Os coccidios *E. tyzzeri, E. beachi* e *E. johnstoni* descriptos na U. R. S. S. por YAKIMOFF e RASTEGAEFF, por emquanto não foram confirmados.

Que saibamos, no Brasil nenhum trabalho foi publicado até agora sobre a coccidiose das gallinhas.

Recebemos fezes de 53 gallinhas de pequenas criações do Municipio de Itapecerica. Pesquisas feitas pelo methodo de DARLING revelaram a existencia de coccidios em 10 amostras (18,8 %). Estes coccidios dividem-se em especies differentes como se vê na tabella 12.

TABELLA 12 — Gallinhas

	Eimeria tenella	*Eimeria maxima*	*E. tenella* + *E. maxima*	*E. tenella* + *E. maxima* + *E. mitis*
Total dos animaes infestados.	3	3	3	1
Porcentagem em relação ao total dos animaes examinados.	5,66	5,66	5,66	1,88
Porcentagem em relação ao total dos animaes infestados.	30	30	30	10

Vemos nesta tabella que *E. tenella* e *E. maxima,* são os mais frequentes.

1. *Eimeria tenella* RAILLIET e LUCET, 1891

Das 53 fezes examinadas, tres continham somente este coccidio (5,66 % em relação ao total dos animaes examinados e 30,0 % em relação ao total dos infestados) e em quatro elle estava associado a outros coccidios (porcentagens correspondentes: 7,5 % a 40,0 %).

Oocystos ovaes, incolores, sem micropyla. Capsula lisa, de duplo contorno.

Existiam raros oocystos. Foram medidos somente seis. As dimensões são: 19,8-28,8 μ × 16,2-25,2 μ. Indice de forma: 1:0,77-0,91.

Em soluto a 2 % de bichromato de potassio desenvolveram-se em cada oocysto quatro esporos e em cada esporo dois esporozoitos. Nos oocystos esporulados não ha corpo residual mas ha granulação polar.

2. *Eimeria maxima* TYZZER, 1929

Esta especie é a maior de todos os coccidios deste genero que parasitam gallinhas.

Tres casos continham só este coccidio (5,66 % em relação ao total das gallinhas examinadas e 30 % em relação ao total das infes-

tadas) e em quatro elle estava associado a outros coccidios (porcentagens correspondentes: 13,2 % e 70,0 %).

Os oocystos são oblongos, escuros, sem micropyla e providos de capsula de duplo contorno. As dimensões (foram medidos 30 oocystos) vêm-se na tabella 13.

TABELLA 13 — *Eimeria maxima*

	30,6	32,4	34,2	36,0	37,8	39,6	Total
21,6	1 (0,70)		1 (0,63)				2
23,4	1 (0,76)	2 (0,72)					3
25,2		5 (0,77)	4 (0,73)	1 (0,70)			10
27,0			1 (0,79)	1 (0,75)	2 (0,71)		4
28,8		1 (0,88)	1 (0,84)	2 (0,80)	2 (0,76)	1 (0,72)	7
30,6				2 (0,85)			2
32,4			1 (0,94)	1 (0,90)			2
Total	2	8	8	7	4	1	30

Nota: Os numeros entre parenthesis são os indices da forma e os que estão fóra representam a quantidade de oocystos medidos.

Vemos nesta tabella que os oocystos medem 30,6-39,6 μ × 21,6-32,4 μ; média 34,8 μ × 26,0 μ; os maiores 39,6 μ × 28,8 μ; os menores 30,6 μ × 21,6 μ; os mais frequentes 32,4 μ × 25,2 μ. Indices da forma: 1:0,63-0,94; média 1:0,77; os mais frequentes, 1:0,77.

Em soluto a 2 % de bichromato de potassio desenvolveram-se em cada oocysto quatro esporos e em cada esporo dois esporozoitos.

Esporulados, os oocystos não têm corpo residual mas possuem granulação polar.

3. *Eimeria mitis* Tyzzer, 1929

Não observamos nenhum caso de parasitismo exclusivo por este coccidio e só num caso encontramol-o associado a outros coccidios (1,9 % em relação ao total das gallinhas examinadas e 10,0 % em relação ao total das parasitadas).

Este é o menor dos coccidios de gallinhas. Os oocystos são ovaes ou redondos com capsula de duplo contorno. As dimensões das formas redondas (foram medidos 30 oocystos) figuram na tabella 14.

TABELLA 14 — *Eimeria mitis*

Dimensões	18,0	19,8	21,6	23,4	25,2	Media: 20,5
Quantidade	9	6	11	2	2	Total: 30

Vemos nesta tabella que os oocystos redondos medem 18,0-25,2 μ; média 20,5 μ; os mais frequentes, 21,6 μ.

Em soluto a 2 % de bichromato de potassio desenvolveram-se em cada ooocysto quatro esporos e em cada esporo dois esporozoitos. Esporulados, os oocystos não tem corpos residuaes mas possuem granulação polar.

Nas fezes de gallinhas examinadas não encontramos a *E. acervulina*. A *E. tenella* e a *E. mitis* eram raras. A mais frequente era a *E. maxima*.

Não temos grande estatistica da porcentagem da infestação de gallinhas em varios paizes; mesmo nos EE. UU. onde o estudo das coccidioses de aves é intensivo, não existe essa estatistica.

CONCLUSÕES

Baseado nos exames feitos, em relação ás coccidioses dos animaes domesticos do Brasil, podemos tirar as seguintes conclusões:

1 — No Brasil ha coccidios no gado bovino, nos carneiros, nos porcos e nas gallinhas.

2) Encontramos os seguintes coccidios: (*)

a) no gado bovino: *E. smithi, E. ellipsoidalis, E. bukidnonensis.* Não encontramos a *E. zürnii,* (I)

b) nos carneiros: *E. arloingi, E. ninae-kohl-yakimovi, E. intricata* e *E. galouzoi.* Não encontramos a *E. faurei* (II) nem *E. parva.*

c) nos porcos: *E. debliecki,* (III) *E. scabra* e *E. perminuta.* Não encontramos a *E. spinosa.*

d) nas gallinhas: *E. tenella,* (IV) *E. maxima,* (V) *E. mitis.* Não encontramos a *E. acervulina.* (VI)

3 — A porcentagem dos animaes parasitados era a seguinte: no gado bovino, 24,4; nos carneiros, 48,9; nos porcos, 84,9 e nas gallinhas 19,8.

(*) Nota da Redacção — Afim de tornar o presente trabalho mais util para os pesquizadores brasileiros, daremos abaixo as indicações bibliographicas que nos foi possivel reunir, referentes á identificação de especies do genero *Eimeria* em animaes domesticos do Brasil, até a presente data:

(I). Encontrada no Rio por FARIA, J. G. *in* PINTO, C. — 1925 — Protozoarios observados no Brasil. *Mem. Inst. Osw. Cruz,* 18, 211-302. Em S. Paulo, por PENHA, A. M. — 1929 — A *Eimeria zürnii* (RIVOLTA, 1878) como causa da coccidiose bovina no Brasil. *Rev. Soc. Paul. Med. Vet.,* 1 2-4.

(II). Encontrada no Rio por PINTO, C. — 1933 — Profilaxia das doenças infecciosas e parasitarias dos animaes domesticos do Brasil. Typ. do Minist. da Agricultura. Rio, Brasil. Assignalada em *Capra hircus,* em S. Paulo, por PACHECO, G. e PENHA, A. M. — 1929 — Verificação da *Eimeria faurei* (MOUSSU e MAROTEL, 1902) e sua frequencia em caprinos de S. Paulo. *Rev. Soc. Paul. Med. Vet.,* 1, 7-8.

(III). Encontrada em S. Paulo, por PINTO, C. — 1933 — Profilaxia, etc. (ver (II)).

(IV). Assignalada no Rio por PINTO, C. e REGENDANZ, P. *in* PINTO, C. — 1934 — Contribuição á hygiene veterinaria. *O Campo,* V, n.º 9, 17-34. Em S. Paulo por REIS, J., REIS, A. S. e NOBREGA, P. — 1934 — Molestias das aves observadas em S. Paulo. *Arch. Inst. Biol.* 5, 41-49.

(V). Mesmas indicações que (IV).

(VI). Assignalada em S. Paulo por REIS, J. e NOBREGA, P. — 1936 — Doenças das aves. Edição do Instituto Biologico. S. Paulo, Brasil. Nesta obra ainda é assignalada a existencia em S. Paulo de *E. necatrix* JOHNSON, 1930, anteriormente assignalada no Rio por PINTO, C. e REGENDANZ P. *in* PINTO, C. — 1934 — Contribuição etc. (ver (IV)).

Em *Meleagris gallopavo domestica,* foi encontrada em S. Paulo *E. meleagridis* TYZZER, 1927 per REIS, J., REIS, A. S. e NOBREGA, P. — 1934 — Molestias etc. (ver (IV)).

Em *Columba livia domestica,* foi encontrada *E. labbeana* PINTO, 1928 no Rio por da CUNHA, A. M. e PINTO, C. *in* PINTO, C. — 1925 — Protozoarios etc. (ver (I)). Em S. Paulo por REIS, J. e NOBREGA, P. — 1936 — Doenças etc. (ver (VI)).

Em *Oryctolagus cuniculus* foram assignaladas no Rio *E. stiedae* (LIND., 1865) por da CUNHA, A. M. e PINTO, C. *in* PINTO, C. — 1925 — Protozoarios etc. (ver (I)); *E. perforans* (LEUCK., 1879) e *E. magna* PERARD, 1925 por da CUNHA, A. M. e PINTO, C. — 1929-30 — *in* PINTO, C. — 1933 — Profilaxia etc. (ver (II)). Nesta obra CESAR PINTO considera *E. media* KESSEL e JANKEWICZ, 1931 synonima de *E. perforans* e *E. irresidua* KESSEL e JANKEWICZ, 1931 synonima de *E. stiedae.*

C. PEREIRA

ABSTRACT

The A., having studied the faeces of various domestic animals, sent to him from the State of S. Paulo, Brazil, for the purpose of detecting the presence of eimeriosis, has arrived at the following conclusions:

1) In Brazil eimeriosis exists in cattle, sheep, pigs, and fowls.

2) He has found the following species of Eimeria:

a) in cattle: E. smithi YAKIMOFF et GALOUZO, *1927, E. ellipsoidalis* BECKER *et* FRYE, *1929 and E. bukidnonensis* TUBANGUI, *1931. He did not find E. zürnii* (RIV., *1878).*

b) in sheep: E. arloingi MAROTEL, *1905, E. ninae-kohlyakimovi* YAKIMOFF et RASTEGAIEFF, *1930, E. intricata* SPIEGEL,

1925 and E. galouzoi YAKIMOFF *et* RASTEGAIEFF, *1930. He did not find: E. faurei* (MOUSSU *et* MAROTEL, *1901) and E. parva* KOTLÁN, MOCTY *et* VADJA, *1929.*

c) in pigs: E. debliecki DOUWES, *1921 E. scabra* HENRY, *1931 and E. perminuta* HENRY, *1931. He did not find: E. spinosa* HENRY, *1931.*

d) in fowls: E. tenella (RAILL. *et* LUC., *1891), E. maxima* TYZZER, *1929 and E. mitis* TYZZER, *1929. He did not find E. acervulina* TYZZER, *1929.*

3) The incidence was as follows: in cattle, 24.4 %; in sheep, 48.9 %; in pigs, 84.9 % and in fowls, 19.8 %.

———o———

ISOSPORA ROCHA-LIMAI n. sp.
PARASITA DA PÊGA (PICA PICA L.)

POR

V. L. Yakimoff e V. F. Gussieff

Trabalho do Instituto de Veterinaria de Leningrado e do Instituto Scientifico-Experimental de Veterinaria, em Novotcherkask

Com estampa 24

Em Maio de 1935, na região Azovsko-Tchernomorski (Norte do districto de Dom, arredores da cidade de Millerovo), numa das duas pêgas *(Pica pica* L., 1758) mortas, achamos oocystos de coccidios no conteúdo do intestino. Existiam duas especies.

Primeira especie

Os oocystos são sub-esphericos. Sem micropyla. Incolores. Foram medidos 100 oocystos cujas dimensões figuram na tabella I.

TABELLA I

	22,8	24,5	Total
18,4	12 (,80)	27 (0,75)	39
19,8	23 (,87)	17 (,81)	40
22,8		21 (,93)	21
Total	35	65	100

Nota: Algarismos sem parenthesis = quantidade dos oocystos medidos.
Algarismos entre parenthesis = indice da forma.

Nesta tabella vemos que o tamanho dos oocystos é igual a 22,8-24,5 $\mu \times$ 18,4-22,8 μ; os médios 23,9 $\mu \times$ 19,9 μ; os maiores, 24,5 $\mu \times$ 28,8 μ; os menores, 22,8 $\mu \times$ 18,4 μ; os mais frequentes, 24,5 $\mu \times$ 18,4 μ. Indice da forma: 1:0,75-0,93, média, 1:0,83; os mais frequentes, 1:0,75.

Collocados em soluto de bichromato de potassio, os oocystos deram dois esporos ovaes de 15,3 $\mu \times$ 9,2 μ cada um, com quatro esporozoitos ovaes de 4,4-6,1 $\mu \times$ 2,2-3,0 μ.

Depois de esporulado, o oocysto apresenta corpo residual que os esporocystos tambem possuem. Os oocystos não contêm granulos polares.

Vemos que este coccidio pertence ao genero *Isospora.*

Porém, no trabalho mais completo de coccidios de aves selvagens de VERWEY, 1926, não encontramos nenhuma *Isospora* que tenha corpo

residual no oocysto. Além disso, como sabemos, ninguem descreveu coccidio na pêga.

Consideramos este coccidio como especie nova e denominamol-o *Isospora rocha-limai*, n. sp. em homenagem ao celebre scientista brasileiro, H. DA ROCHA LIMA.

Segunda especie

Este coccidio é redondo. Incolor. As dimensões (foram medidos 100 oocystos) vêm-se na tabella 2.

TABELLA II

Dimensões	19,8	21,4	22,8	24,5	25,9	Total	23,3	25,9
Quantidade	21	13	19	16	31	100	Media	Mais frequentes

Vemos nesta tabella que as dimensões dos oocystos são 19,6-25,9 μ; em média 23,3 μ os mais frequentes, 25,9 μ.

Postos em soluto de bichromato de potassio, os oocystos deram dois esporos redondos de 10,6-12,2 μ cada um, com dois esporozoitos redondos de 3,0-3,7 μ.

Depois de esporulado, o oocysto apresenta corpo residual somente nos esporocystos. Nos oocystos estas formações não existem, mas nelles, ás vezes, apparece granulo polar.

Como vemos, este coccidio distingue-se do acima descripto pela ausencia de corpo residual no oocysto. E' possivel que elle pertença á especie de *Isospora* das pequenas aves que até agora é conhecida sob a denominação de *Isospora lacazei* LABBÉ, 1893.

ABSTRACT

The authors studied two species of Isospora obtained from the intestine of one of two specimens of the European magpie (Pica pica L.), *killed near the city of Millerov, in the north of the district of the Don, U.R.S.S. Detailed descriptions of the parasites are given, one being classified as Isospora rocha-limai n. sp. and the second, tentatively, as Isospora lacazei* LABBÉ, *1893.*

BIBLIOGRAPHIA

VERWEY, J. — 1926 — Infectieproevenn met vogelcoccidien. *Inaug. Dissertation.* Leiden.

A

B

Fig. A — *Isospora rocha-limai* n. sp.
Fig. B — *Isospora lacazei* LABBÉ, 1893

ACÇÃO ANTIRACHITICA DO OLEO DE CAPIVARA E DE DIVERSOS OLEOS VEGETAES

(VERIFICAÇÃO ANATOMO-PATHOLOGICA)

POR

J. Saborido

Trabalho do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 25-29

Caracterisado histopathologicamente o rachitismo humano e descoberta sua causa, procuraram os pesquizadores um animal que servisse para o seu estudo experimental. Encontraram-no, no rato, com o qual fizeram inumeras experiencias, tendo por fim a verificação da existencia da vitamina antirachitica em determinadas substancias. Pela administração a ratos, de diétas defficientes nesse principio, produziam o rachitismo experimental; o accrescimo de tal ou qual substancia á diéta, já sabida rachitogenica, permittia aos ratos um crescimento normal, sem que os exames realisados revelassem a menor lesão. São assim muito conhecidos os trabalhos de HESS, PAPPENHEIMER, MC COLLUM e seus collaboradores, quasi todos usando como producto antirachitico, o oleo de figado de bacalhau.

Querendo verificar experimentalmente, o que ha de certo no conceito popular em que é tido o oleo de capivara, o dr. D. DE OLIVEIRA assistente da cadeira de Physiologia da Faculdade de Medicina desta Capital, emprehendeu uma serie de estudos sobre o seu poder anti-rachitico.

Os animaes por elle usados em suas experiencias, nos foram enviados para a comprovação histologica dos resultados; é ella que forma o texto deste trabalho. Resumimo-nos á simples referencia do que vimos nesses animaes, e em alguns outros, nos quaes foi estudada a acção de diversos oleos vegetaes. Detalhes do methodo experimental seguido, resultados e conclusões fazem parte do trabalho que sobre o mesmo assumpto publicou o Dr. D. DE OLIVEIRA.

Estudo da acção anti-rachitica do oleo de capivara. — Em dois grupos podemos dividir os animaes que recebemos, correspondentes, o primeiro á verificação da capacidade do oleo de capivara corrigir a alimentação defficiente em vitamina calcio-fixadora, e o segundo á verificação de sua actividade de accordo com o modo de preparação. Dividimos cada um destes grupos em dois sub-grupos, para facilidade de exposição.

A) Dois typos de experiencias isolamos nos animaes deste primeiro grupo: um, relativo á existencia ou não de vitamina anti-rachitica no oleo de capivara; outro, depois dos resultados positivos do primeiro, referente á quantidade de oleo necessaria para actuar anti-rachiticamente.

a) Dos animaes que serviram para as experiencias de verificação do poder anti-rachitico do oleo de capivara, vamos referir os resultados de quatro; desses, dois receberam o oleo e outros serviram de testemunhas. Transcrevemos a seguir o que ha de interessante nos protocollos desses animaes, ordenando-os segundo o tratamento recebido.

Rato n.º 17-52 (Dr. DUTRA); n.º 2115 (Inst. Biologico, S. de Anat. Pathologica).

Tratamento: Mistura de Mc COLLUM
Escuridão.

Inicio da experiencia: 28-1-33.
Fim da experiencia: 17-3-33.

Exame microscopico

Extremidade inferior do femur. — Cartilagem de ossificação ligeiramente espessada, vendo-se do lado da diaphyse diversas projecções de cellulas cartilaginosas, as quaes se resolvem numa camada de calcificação preparatoria, francamente espessada. Nas vizinhanças dos condylos e abaixo da cartilagem ha o tecido osteoide que está francamente augmentado.

Extremidade superior da tibia. — Mesmos caracteres que na extremidade inferior do femur, com lesões muito intensas. Chama a attenção o apparecimento de diversas areas vascularisadas entre a cartilagem e a zona de calcificação preparatoria.

Orgãos normaes, com excepção do coração, figado e rim nos quaes existia degeneração parenchymatosa.

Resultado. — Francos signaes de rachitismo.

Rato n.º 22-62 (Dr. DUTRA); n.º 2119 (Inst. Biologico, S. de Anat. Pathologica).

Tratamento:
Mistura de Mc COLLUM — 100 grs.
Vigantol — 10 gottas

Inicio da experiencia: 28-1-33.
Fim da experiencia: 17-3-33.

Exame microscopico

Extremidade inferior do femur. — A cartilagem de ossificação é delgada e regular. Zona de calcificação preparatoria, mostrando diversas trabeculas de tecido osteoide que se resolvem em trabeculas bem desenvolvidas, todas regularmente dispostas. Não ha excessos de tecido osteoide nas vizinhanças dos condylos.

Extremidade superior da tibia. — Mesmo aspecto que o descripto na extremidade inferior do femur.

Orgãos normaes, com excepção do figado e do rim, nos quaes existia degeneração parenchymatosa.

Resultado. — Ossificação com caracteres normaes.

Rato n.º 21-60 (Dr. DUTRA); n.º 2118 (Inst. Biologico, S. de Anat. Pathologica).

Tratamento:

Mistura de Mc COLLUM — 100 grs.
Oleo de capivara — 20 gottas

Inicio da experiencia: 28-1-33.
Fim da experiencia: 17-3-33.

Exame microscopico

Extremidade inferior do femur. — O exame histologico chama a attenção pelo facto de apresentar uma cartilagem de ossificação, delgada, e bastante uniforme em sua espessura. Nas vizinhanças dos condylos não ha excesso de tecido osteoide. A zona de calcificação preparatoria é muito regular e delgada, percebendo-se, em contacto directo com a mesma, grande numero de trabeculas osseas delgadas, francamente desenvolvidas. Entre a zona de calcificação preparatoria e as trabeculas, quasi que não existe tecido osteoide.

Extremidade superior da tibia. — Mesmos caracteres que os descriptos na extremidade inferior do femur.

Orgãos normaes, com excepção do coração e do rim, nos quaes existia degeneração parenchymatosa.

Resultado. — Ossificação com caracteres normaes.

Rato n.º 59 (Dr. DUTRA); n.º 2.113 (Inst. Biologico, S. de Anat. Pathologica).

Tratamento:

Mistura de Mc COLLUM — 100 grs.
Oleo de capivara — 25 gottas

Inicio da experiencia: 28-1-33.
Fim da experiencia: 17-3-33.

Exame microscopico

Extremidade inferior do femur. — Caracteres normaes; cartilagem estreita; zona de calcificação preparatoria, delgada, muito discreta.

Extremidade superior da tibia. — Mesmos caracteres da extremidade inferior do femur.

Orgãos normaes, com excepção do coração, figado e rim nos quaes existia degeneração parenchymatosa.

Resultado. — Ossificação da extremidade inferior do femur e da extremidade superior da tibia com caracteres normaes.

Em resumo, havia nesta primeira serie dois ratos alimentados com a diéta rachitogenica de Mc Collum, accrescida de oleo de capivara; não encontrámos lesões de rachitismo nesses dois animaes. Havia ainda, um rato alimentado com a diéta referida mais Vigantol e um, que apenas recebeu a alimentação defficiente em vitamina calcio-fixadora. Não achámos lesões de rachitismo naquelle, mas as encontrámos bem accentuados no ultimo.

b) Recebemos para exame histopathologico seis ratos que foram usados no estudo da actividade do oleo de capivara em dóses crescentes. Dos resultados desses exames, damos a seguir os dados mais importantes. Ordenamol-os por ordem crescente e a cada rato em experiencia juntamos o respectivo testemunha.

Rato n.º 4-25 (Dr. Dutra); n.º 2312 (Inst. Biologico, S. de Anat. Pathologica).

Tratamento:

Mistura de Mc Collum — 10 grs.
Oleo de capivara — 1 gotta
Glycerina — 1 cc.

Inicio da experiencia: 26-5-33.
Fim da experiencia: 26-6-33.

Exame microscopico

Extremidade inferior do femur. — A zona de calcificação preparatoria apresenta diversas irregularidades em sua estructura. Camada esponjosa tambem bastante irregular e muito espessa nas porções vizinhas do periosteo.

Extremidade superior da tibia. — Mesmo aspecto que o observado na extremidade inferior do femur.

Cartilagem chondro-costal. — Adiantados signaes de rachitismo. Orgãos normaes.

Resultado — Adiantados signaes de rachitismo.

Rato n.º 3-24 (Dr. Dutra); n.º 2311 (Inst. Biologico, S. de Anat. Pathologica).

Tratamento:

Mistura de Mc Collum — 10 grs.
Vigantol — 1 gotta
Glycerina — 1 cc.

Inicio da experiencia: 26-5-33.
Fim da experiencia: 26-6-33.

Exame microscopico

Extremidade inferior do femur. — A zona de calcificação preparatoria apresenta-se irregular e invadida em diversos pontos por capillares da medulla.

Extremidade superior da tibia. — Mesmo aspecto que o descripto na extremidade inferior do femur.

Cartilagem chondro-costal. — Mostra ligeiros signaes de rachitismo.

Orgãos normaes, com excepção do rim que mostrava degeneração parenchymatosa.

Resultado. — Ligeiros signaes de rachitismo.

Rato n.º 26 (Dr. DUTRA); n.º 2325 (Inst. Biologico, S. de Anat. Pathol.).
Tratamento:

Mistura de Mc COLLUM	— 10 grs.
Oleo de capivara	— 3 gottas
Glycerina	— 1 cc.

Inicio da experiencia: 29-5-33.
Fim da experiencia: 3-7-33.

Exame microscopico

Extremidade inferior do femur. — Linha de calcificação preparatoria normal.

Extremidade superior da tibia. — Linha de calcificação normal.

Cartilagem chondro-costal. — Em algumas costellas a linha de ossificação da cartilagem chondro-costal apresenta pequenas irregularidades.

Nos orgãos, havia pequenos fócos de necrose no figado, e degeneração parenchymatosa no rim.

Resultado. — Ossificação praticamente normal.

Rato n.º 27 (Dr. DUTRA); n.º 2326 (Inst. Biologico, S. de Anat. Pathol.).
Tratamento:

Regimen de Mc COLLUM	— 10 grs.
Vigantol	— 3 gottas
Glycerina	— 1 cc.

Inicio da experiencia: 29-5-33.
Fim da experiencia: 3-7-33.

Exame microscopico

Extremidade inferior do femur. — A zona de calcificação preparatoria mostra algumas irregularidades. Na camada esponjosa que é bastante espessa, vêm-se pequenas areas cartilaginosas em continuação com a camada de calcificação preparatoria.

Extremidade superior da tibia. — Em plena esponjosa percebe-se um nodulo cartilaginoso; a porção limite entre a esponjosa e a zona de calcificação preparatoria, é relativamente nitida.

Cartilagem chondro-costal. — Espessa zona de calcificação preparatoria, irregular devido á penetração de diversos vasos vindos da medulla.

Nos orgãos, havia pneumonia intersticial e degeneração parenchymatosa do rim.

Resultado. — Signaes de rachitismo.

Rato n.º 29 (Dr. DUTRA); n.º 2328 (Inst. Biologico, S. de Anat. Pathol.).

Tratamento:

Regimen de Mc COLLUM	— 10 grs.
Oleo de capivara	— 5 gottas
Glycerina	— 1 cc.

Inicio da experiencia: 29-5-33.
Fim da experiencia: 3-7-33.

Exame microscopico

Extremidade inferior do femur. — Calcificação normal.

Extremidade superior da tibia. — Calcificação normal.

Cartilagem chondro-costal. — Calcificação normal.

Nos orgãos, havia indicios de edema pulmonar, degeneração parenchymatosa do rim e indicios de processo inflammatorio renal.

Resultado. — Ossificação normal.

Rato n.º 28 (Dr. DUTRA); n.º 2327 (Inst. Biologico, S. de Anat. Pathol.).

Tratamento:

Regimen de Mc COLLUM	— 10 grs.
Vigantol	— 5 gottas
Glycerina	— 1 cc.

Inicio da experiencia: 29-5-33.
Fim da experiencia: 3-7-33.

Exame microscopico

Extremidade inferior do femur. — Linha de calcificação preparatoria muito delgada e perfeitamente regular. Esponjosa delgada.

Extremidade superior da tibia. — Mesmo aspecto que o descripto na extremidade inferior do femur.

Cartilagem chondro-costal. — Calcificação normal.

Havia degeneração parenchymatosa no rim. Outros orgãos normaes.

Resultado. — Ossificação normal.

Resumindo, o exame histologico dos seis ratos referidos, revelou que os tratados com oleo de capivara já não apresentaram lesões rachiticas desde a dóse de 3 gottas do oleo para 10 grammas de mistura de Mc COLLUM. Nos animaes testemunhas, o que recebeu 3 gottas de Vigantol para 10 grammas de mistura de Mc COLLUM, ainda apresentou signaes de rachitismo; só o que recebeu 5 gottas se mostrou normal.

B) Em todas as experiencias cujos resultados histologicos referimos até agora, foi usado o oleo de capivara preparado pela acção dos raios solares sobre a gordura desse animal. Nesta segunda serie recebemos animaes que foram tratados com oleo preparado pela acção do calor (gaz de illuminação) e outros que receberam diversos extractos do oleo, uns soluveis em ether, outros em alcool.

a) Transcrevemos a seguir os resultados dos exames histopathologicos procedidos em dois ratos que receberam oleo de capivara preparado pela acção do calor.

Rato: (Gaiola 8 — 3.º film — Radiographia 7 — Chapinha 73 (Dr. DUTRA); n.º 2695 (Inst. Biologico, Secção de Anatomia Pathologica).

Tratamento:

Mistura de Mc COLLUM

Oleo de capivara, preparado pela acção do calor (Gaz de illuminação).

Exame microscopico

Cartilagem chondro-costal. — Grande espessamento da cartilagem de ossificação.

Nos orgãos, havia degeneração parenchymatosa do figado e necroses epitheliaes nos rins. Os outros orgãos estavam normaes.

Resultado. — Rachitismo.

Rato: (Gaiola 7 — 2.º film — Radiographia 5 — Chapinha 67 (Dr. DUTRA); n.º 2694 (Inst. Biologico, Secção de Anatomia Pathologica).

Tratamento:

Mistura de Mc COLLUM

Oleo de capivara, preparado pela acção do calor (Gaz de illuminação).

Exame microscopico

Cartilagem chondro-costal. — Grande espessamento da cartilagem de crescimento. Periosteos espessados graças ao desenvolvimento de um tecido esteoide debaixo dos mesmos. A camada esponjosa apresenta diversas incursões na zona de calcificação preparatoria.

Os orgãos estavam normaes, com excepção do rim, no qual havia necroses epitheliaes.

Resultado. — Rachitismo.

Dispensamos a transcripção dos resultados dos exames dos ratos testemunhas; em todos elles a ossificação era normal. Quanto aos que acabamos de referir, vemos que o preparo do oleo pela acção do calor artificial parece tornal-o incapaz de agir anti-rachiticamente.

b) Recebemos tambem diversos ratos que tinham sido alimentados com a diéta de Mc COLLUM e extractos diversos de oleo de capivara. Eis os resultados do exame histologico de tres desses animaes.

Rato 80 — II (Dr. DUTRA); n.º 2971 (Inst. Biologico, S. de Anat. Pathol.).

Tratamento: Diéta de MC COLLUM mais extracto de oleo de capivara soluvel no ether.

Exame microscopico

Ossos longos. — Cartilagem de ossificação delgada continuando-se com uma zona de calcificação preparatoria de caracteres normaes.

Resultado. — Ossificação normal.

Rato 81 — III (Dr. DUTRA); n.º 2972 (Inst. Biologico, S. de Anat. Pathol.).

Tratamento: Diéta de MC COLLUM mais extracto de oleo de capivara soluvel no alcool.

Exame microscopico

Ossos longos. — Cartilagem de ossificação delgada. Zona de calcificação preparatoria com caracteres normaes.

Resultado. — Ossificação normal.

Rato 82 — IV (Dr. DUTRA); n.º 2973 (Inst. Biologico, S. de Anat. Pathol.).

Tratamento: Diéta de MC COLLUM mais extracto total de oleo de capivara, soluvel no alcool.

Exame microscopico

Ossos longos. — Cartilagem de ossificação delgada. Zona de calcificação preparatoria com caracteres normaes.

Resultado. — Ossificação normal.

Ao contrario, pois, do que se dá com o uso do oleo de capivara preparado pelo calor, parece que seus diversos extractos não perdem a propriedade anti-rachitica. Deixamos tambem neste caso, de transcrever os resultados do exame histologico dos ratos testemunhas.

Estudo da acção anti-rachitica de diversos oleos vegetaes. — Além dos ratos cujos resultados histologicos acabamos de referir, recebemos mais alguns, nos quaes foi experimentada a acção de diversos oleos vegetaes. Damos a seguir o que encontrámos nesses animaes.

Rato n.º 75 (Dr. DUTRA); n.º 2178 (Inst. Biologico, S. de Anat. Pathol.).

Tratamento:

Mistura de MC COLLUM — 80 grs.
Castanha do Pará (irradiada) — 20 grs.
Animal conservado no escuro.

Inicio da experiencia: 28-1-33.
Fim da experiencia: 19-4-33.

Exame microscopico

Extremidade inferior do femur. — Na superficie epiphysaria da cartilagem de ossificação encontram-se irregularidades, devidas a pequenas infiltrações da zona de calcificação preparatoria para o lado da esponjosa primaria.

Extremidade superior da tibia. — Cartilagem de ossificação com caracteres normaes.

Cartilagem chondro-costal. — Aspecto normal.

Orgãos normaes.

Resultado. — Ossificação praticamente normal.

Rato n.º 76 (Dr. DUTRA); n.º 2179 (Inst. Biologico, S. de Anat. Pathol.).

Tratamento:

Mistura de MC COLLUM — 80 grs.
Castanha de cajú (irradiada) — 20 grs.
Animal conservado no escuro.

Inicio da experiencia: 18-1-33.

Fim da experiencia: 19-4-33.

Exame microscopico

Extremidade inferior do femur. — Cartilagem de ossificação praticamente normal.

Extremidade superior da tibia. — Cartilagem de ossificação normal.

Cartilagem chondro-costal. — Normal.

Orgãos normaes.

Resultado. — Ossificação normal.

Rato n.º 30 (Dr. DUTRA); n.º 2329 (Inst. Biologico, S. de Anat. Pathol.).

Tratamento:

Mistura de MC COLLUM — 10 grs.
Oleo de amendoim — 5 gottas
Glycerina — 1 cc.

Inicio da experiencia: 29-5-33.

Fim da experiencia: 3-7-33.

Exame microscopico

Extremidade inferior do femur. — A linha de calcificação preparatoria apresenta nitidas irregularidades. Da zona esponjosa vêm-se alguns vasos que atravessam a zona de calcificação preparatoria. Nas vizinhanças do periosteo, no meio da esponjosa percebem-se diversas areas formadas por tecido cartilaginoso.

Extremidade superior da tibia. — Mesmo quadro que o descripto no femur.

Cartilagem chondro-costal. — A porção em vias de ossificação apresenta-se muito dilatada; a zona de calcificação preparatoria é espessa, irregular, e invadida por vasos vindos da medulla. A esponjosa é tambem muito espessa e dotada de zonas cartilagineas, sem signaes de ossificação.

Os orgãos estavam normaes com excepção do rim, no qual havia degeneração parenchymatosa.

Resultado. — Accentuado rachitismo.

Rato n.º 47 (Dr. DUTRA); n.º 2466 (Inst. Biologico, S. de Anat. Pathol.).
Tratamento:

Mistura de Mc COLLUM	— 10 grs.
Oleo de girasol	— 2 gottas
Glycerina	— 1 cc.

Inicio da experiencia: 21-7-33.
Fim da experiencia: 21-8-33.

Exame microscopico

Extremidade inferior do femur. — Espessamento consideravel da epiphyse; zona de calcificação preparatoria bastante desenvolvida e muito irregular. Não ha linha de separação nitida entre a esponjosa e esta zona, devido á invasão de porções da zona de calcificação na esponjosa.

Extremidade superior da tibia. — Aspecto semelhante ao da extremidade inferior do femur.

Articulação chondro-costal. — Zona de calcificação preparatoria bem desenvolvida; porções corticaes espessas. Trabeculas da camada esponjosa tambem bastante espessas.

Nos orgãos; lesões de encephalite; degeneração parenchymatosa no rim.

Resultado: — Signaes de rachitismo.

Rato n.º 58 (Dr. DUTRA); n.º 2468 (Inst. Biologico, S. de Anat. Pathol.).
Tratamento:

Mistura de Mc COLLUM	— 10 grs.
Oleo de gergelim	— 5 gottas
Glycerina	— 1 cc.

Inicio da experiencia: 28-7-33.
Fim da experiencia: 28-8-33.

Exame microscopico

Extremidade inferior do femur.—Francos signaes de rachitismo.

Extremidade superior da tibia.—Francos signaes de rachitismo.

Articulação chondro-costal. — Francos signaes de rachitismo. Havia degeneração parenchymatosa do rim.

Resultado. — Francos signaes de rachitismo.

Rato n.º 59 (Dr. DUTRA); n.º 2469 (Inst. Biologico, S. de Anat. Pathol.).
Tratamento:

Mistura de Mc COLLUM	— 10 grs.
Oleo de soja	— 2 gottas
Glycerina	— 1 cc.

Inicio da experiencia: 28-7-33.
Fim da experiencia: 28-8-33.

Exame microscopico

Extremidade inferior do femur.—Francos signaes de rachitismo.
Extremidade superior da tibia.—Francos signaes de rachitismo.
Articulação chondro-costal. — Francos signaes de rachitismo.
Havia degeneração parenchymatosa do rim.

Resultado. — Francos signaes de rachitismo.

Com excepção, portanto, dos oleos de castanha do Pará e de cajú, previamente irradiados, não se observa nenhuma actividade anti-rachitica nos diversos oleos vegetaes estudados.

Podemos dizer em resumo, que o resultado do exame histopathologico dos ossos dos ratos que nos foram enviados para estudo, demonstra uma acção anti-rachitica do oleo de capivara, quando não preparado pelo calor artificial, e uma inactividade dos diversos oleos vegetaes estudados, com excepção dos oleos de castanha do Pará e de cajú, previamente irradiados.

ABSTRACT

In the Department of Physiology of the Medical School of São Paulo, Dr. D. DE OLIVEIRA, *has made several experiments in order to verify the action of «capivara» (Hydrochoerus hydrochoerus* L., *1766) oil and of several vegetable oils, in the prevention of rickets in rats. The bones have been sent to us for histo-pathological examination, permitting the observation of the following facts.*

1) The addition to Mc Collum's diet of «capivara» oil, prepared by exposure to sunlight of the fat of this animal, promotes a normal ossification.

2) The addition to the same diet of «capivara» oil obtained by melting the fat by artificial heat, results in the production of rickets.

3) The addition of either ether or alcoholic soluble extracts of «capivara» oil to the diet of Mc COLLUM, *is favourable to a normal bone formation.*

4) The Brasil nut (Bertholletia excelsa H. B. K.) and cajú nut (Anacardium occidentale L.) *oils, previously irradiated, leads to a normal ossification.*

5) The addition to the diet of Mc COLLUM *of either peanut, (Arachis hypogea* L.), *topinamber, (Helianthus tuberosus* L.) *sesame, (Sesamum indicum* L.) *or soy bean (Glycine hispida* MAXIM.) *oils, does not interfere in the production of rickets.*

BIBLIOGRAPHIA

OLIVEIRA, J. DUTRA DE — 1936 — Avitaminoses. (Estudo bio-chimico das vitaminas e manifestações experimentaes). *Annaes da Faculdade de Medicina da Un. de S. Paulo*, **12**, 11-125.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 25

Fig. A — Extremidade superior da tibia do rato de n.º 2115 da Secção de Anatomia Pathologica. Alimentado com mistura de Mc COLLUM e conservado na escuridão.
Rachitismo.

Fig. B — Extremidade inferior do femur do rato de n.º 2118 da Secção de Anatomia Pathologica. Alimentado com mistura de Mc COLLUM (100 grs.) e oleo de capivara preparado pela acção dos raios solares (20 gottas).
Ossificação normal.

Estampa 26

Fig. C — Cartilagem chondro-costal do rato de n.º 2694 da Secção de Anatomia Pathologica. Alimentado com mistura de Mc COLLUM e oleo de capivara preparado pela acção do calor (gaz de illuminação).
Rachitismo.

Fig. D — Extremidade inferior do femur do rato de n.º 2971 da Secção de Anatomia Pathologica. Alimentado com mistura de Mc COLLUM e extracto de oleo de capivara soluvel no ether.
Ossificação normal.

Estampa 27

Fig. E — Extremidade inferior do femur do rato de n.º 2973 da Secção de Anatomia Pathologica. Alimentado com mistura de Mc COLLUM mais extracto total de oleo de capivara, soluvel no alcool.
Ossificação normal.

Fig. F — Cartilagem chondro-costal do rato de n.º 2179 da Secção de Anatomia Pathologica. Alimentado com mistura de Mc COLLUM e castanha do cajú (irradiada). Conservado no escuro.
Ossificação normal.

Estampa 28

Fig. G — Cartilagem chondro-costal do rato de n.º 2329 da Secção de Anatomia Pathologica. Alimentado com mistura de Mc COLLUM, oleo de amendoim e glycerina.
Rachitismo.

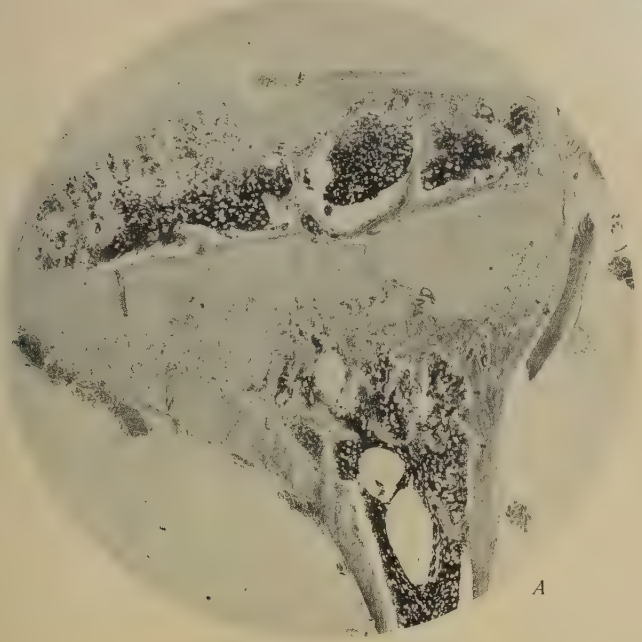
Fig. H — Extremidade superior da tibia do rato de n.º 2466 da Secção de Anatomia Pathologica. Alimentado com mistura de Mc COLLUM, oleo de girasol e glycerina.
Rachitismo.

Estampa 29

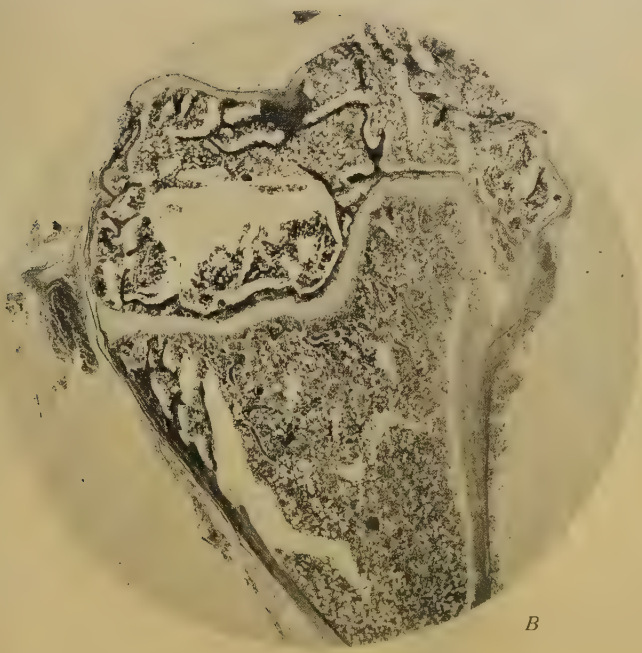
Fig. I — Extremidade superior da tibia do rato de n.º 2468 da Secção de Anatomia Pathologica. Alimentado com mistura de Mc COLLUM, oleo de gergelim e glycerina.
Rachitismo.

Fig. J — Extremidade superior da tibia do rato de n.º 2469 da Secção de Anatomia Pathologica. Alimentado com mistura de Mc COLLUM, oleo de soja e glycerina.
Rachitismo.

———o———

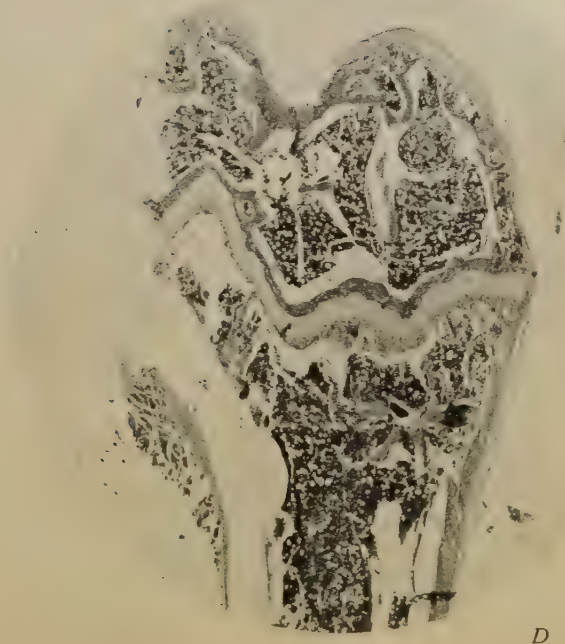


A

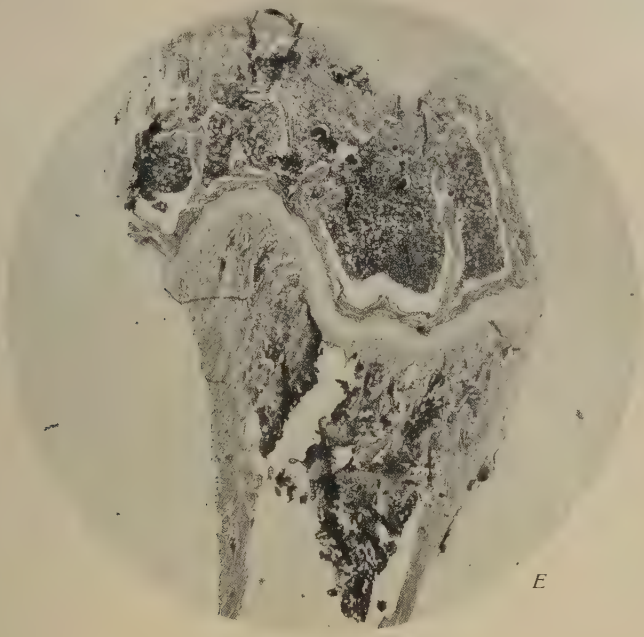


B

C

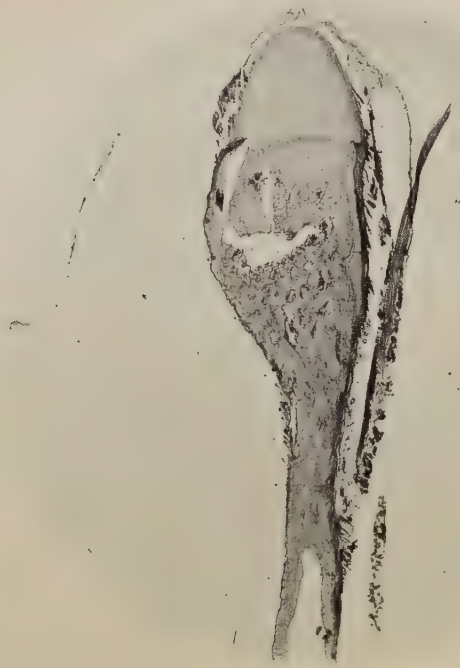


D

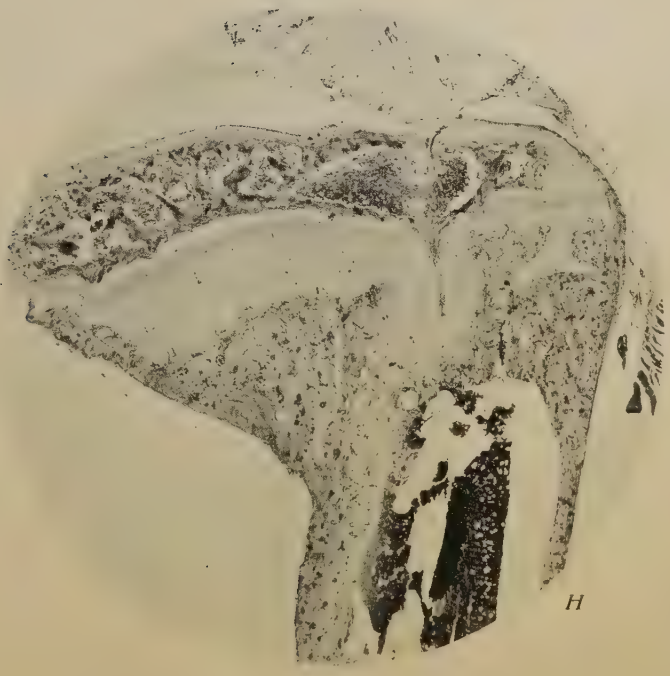


E

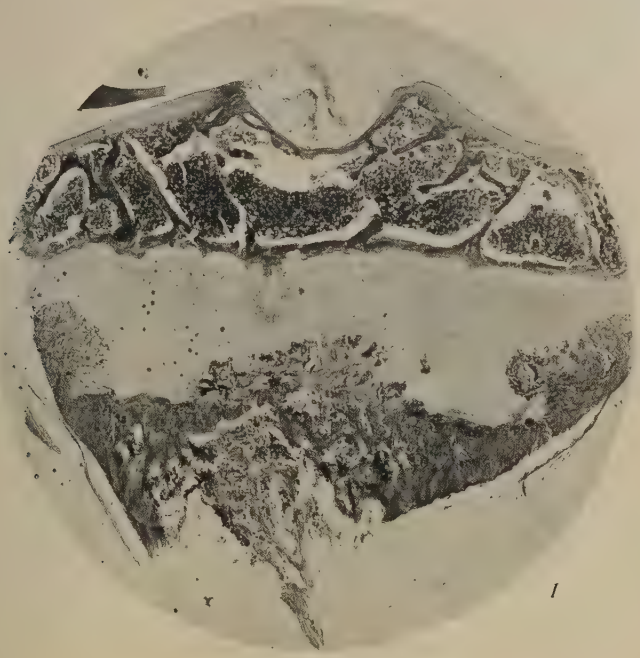
F



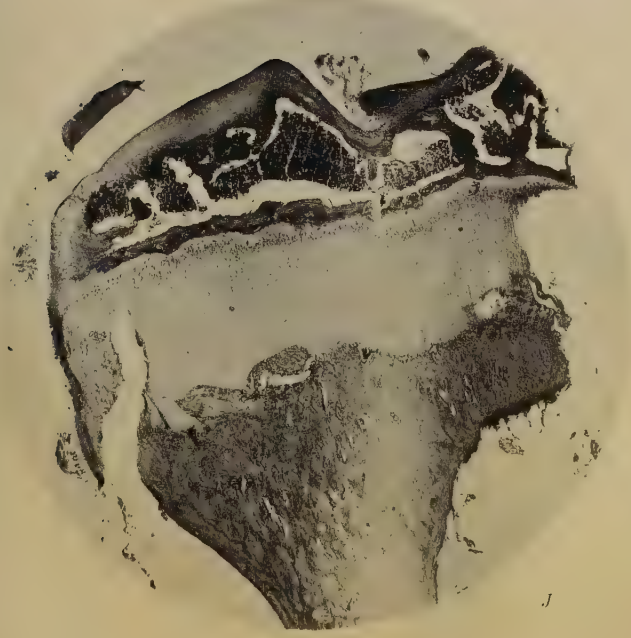
G



H



I



J

SOBRE ALGUNS PHENÓMENOS DA VIDA DOS BRYOZOARIOS MARINHOS

POR

E. Marcus

Trabalho do Instituto de Zoologia da Universidade de S. Paulo

Com 7 figuras no texto

Em sua posição normal, o individuo dos Bryozoarios estende a corôa tentacular para fóra, respirando e alimentando-se por meio dos tentaculos (Fig. 2). Quando uma lesma, concha ou um outro animal bryozóphago se approxima da colonia, retraem-se os tentaculos instantaneamente por meio de musculos fortes, e um operculo corneo fecha o orificio do estojo no qual os orgãos molles repousam. Nas especies de parede anterior membranosa dá-se em seguida a evaginação por meio de musculos que puxam essa parede para dentro, diminuindo assim o espaço interior, e dahi resulta uma expremedura dos tentaculos, juntamente com a parte buccal e anal do intestino (Fig. 2). Nas formas numerosas de parede anterior calcarea (Fig. 1), a acção de estreitar o espaço interior, necessaria para a evaginação dos referidos orgãos, é effectuada por um sacco compensatorio *(c)*. Este apparelho hydrostatico origina-se duma dobra da parede membranosa, a qual se introflete para dentro. Esse sacco muitas vezes se póde fechar por meio da parte inferior do operculo *(p)*. Ao contrahirem-se os musculos deste operculo, assim como tambem aquelles que se inserem na parede interior do sacco, enche-se este ultimo de agua, e assim são os tentaculos expremidos, verificando-se a consequente evaginação delles. Na sua invaginação, a repleção do espaço interior expulsa a agua para fóra do sacco compensatorio. Seja, porém frizado, que ha Bryozoarios (Gen. *Cellaria)*, cuja parede anterior é completamente calcificada, sem que exista um sacco compensatorio. Ignora-se ainda o mecanismo da evaginação em taes formas.

Egualmente outros problemas ha por resolver, principalmente no vasto assumpto da historia do desenvolvimento dos Bryozoarios. Resta p. ex. saber se a fecundação dos ovos nesses animaes, em geral hermaphroditas, é realisada pelos espermatozoides do mesmo individuo ou se é ella mutua. Se acontecer, como é bastante provavel, a fecundação dentro do mesmo individuo, concordaria isso com outros caractéres de reducção nos Bryozoarios, pois é considerada sempre como uma involução, mesmo nos Protozoarios, a autofecundação, a qual entre os animaes multicellulares sómente existe em alguns vermes,

conchas, lesmas e peixes. Observou-se a presença dum póro (Fig. 3) ou dum tubo (orgão intertentacular, Fig. 2) entre a bocca e os tentaculos, em varias especies. Pelo póro ou pelo tubo poder-se-ia effectuar a penetração dos espermatozoides em todas as fórmas em que não se tornam maduros, simultaneamente, os ovos e espermatozoides do mesmo animal. Os ovos fecundados chegam para fóra por essa communicação entre a cavidade do corpo e a agua, desenvolvendo-se ora no fundo do mar, ora em bolsas de incubação especiaes, para as quaes são levados por approximarem-se as aberturas da bolsa e do tubo (Fig. 3).

A gemmação, portanto uma propagação asexual, que desempenha papel importantissimo em todos os animaes sesseis, especialmente em nosso grupo, sobrevem mesmo no desenvolvimento dos embryões duma ordem dos Bryozoarios, os Cyclostomatos. Numa phase, que verosimilmente corresponde á gastrula, o chamado embryão primario (Fig. 5, *e)* lança botões, formando assim embryões secundarios *(s),* os quaes ainda pódem fornecer terciarios. Desse modo nascem dum unico ovo mais de cem larvas. A celebre definição que reza «ser toda reproducção um crescimento que ultrapassa a medida individual», evidencia-se perfeitamente nos Cyclostomatos. Como, nos Bryozoarios a gemmação geralmente substitue a multiplicação sexual, assim a formação de botões compensa no desenvolvimento descripto dos embryões dos Cyclostomatos o pequeno numero dos ovos. Só bem poucos individuos das colonias deste grupo contêm ovos, dos quaes sómente alguns ainda logram desenvolver-se regularmente. Ha Bryozoarios de agua doce, cujo desenvolvimento sexual, em certas localidades ou regiões, está completamente supprimido e substituido pela gemmação durante varios annos.

E' de importancia decisiva a gemmação, não sómente para multiplicar o numero dos individuos de Bryozoarios, mas tambem para manter a vida normal do individuo. Faltando nas formas marinhas orgãos excretorios verdadeiros, e sendo pelo menos o tubo, entre as referidas communicações entre a cavidade do corpo e o meio ambiente, uma formação transitoria, dá-se uma accumulação das escorias do metabolismo no interior do estojo, o qual é fechado de todos os lados. No intestino taes escorias depositam-se, e, por isso, torna-se elle successivamente menos capaz da funcção normal de colher alimento e digeril-o. O resultado dessa auto-intoxicação parcial é uma degeneração total de todo o apparelho nutritivo (Fig. 4, *n),* reduzindo-se elle ao chamado «corpo bruno». Durante o atrophiamento do intestino, cellulas moveis (amebocytos, phagocytos), cercando o corpo bruno, armazenam as suas substancias que ainda pódem servir para sustentar o cresci-

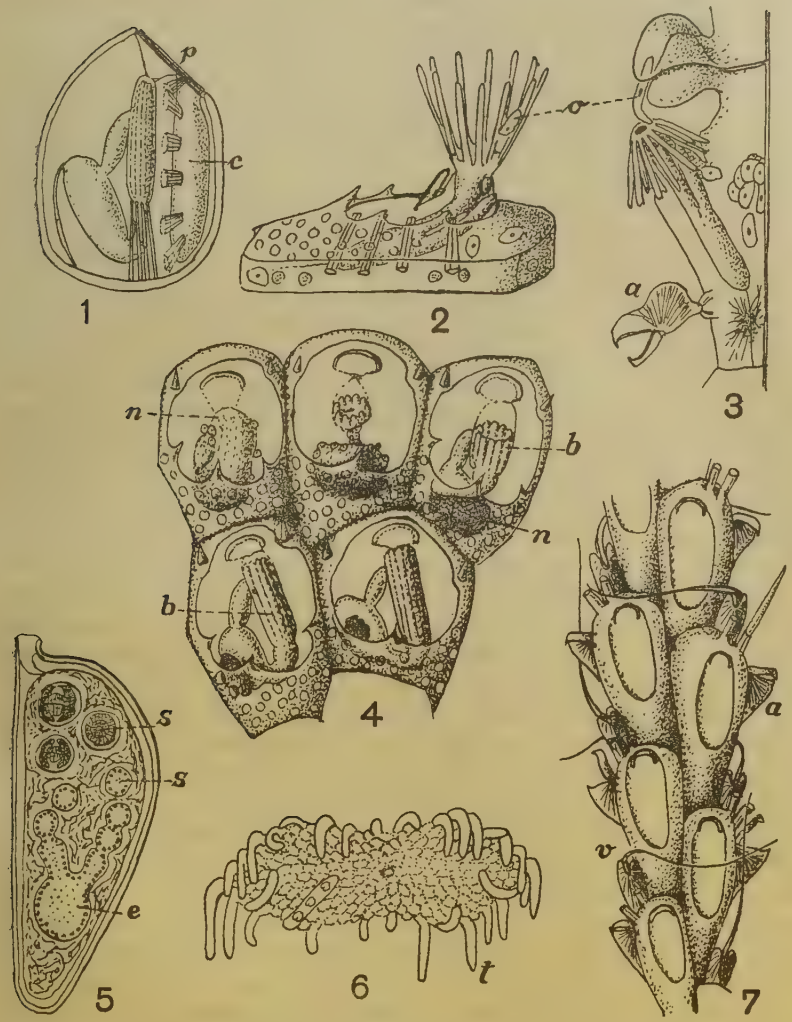


Fig. 1 — Individuo commum (autozoecio) dos Bryozoarios cheilostomatos com sacco compensatorio (Subordem: Ascophora). Fig. 2 — O mesmo com parede membranosa (Subordem: Anasca); um ovo em transito pelo orgão intertentacular. Fig. 3 — Transmissão do ovo para a bolsa de incubação (oecio, ovicella). Fig. 4 — Degeneração do apparelho nutritivo em corpo bruno e formação do novo broto. Fig. 5 — Polyembryonia dos Bryozarios cyclostomatos. Fig. 6 — Gemmação dos tubos adhesivos. Fig. 7 — Vibraculas com as cerdas em varias posições. *a* — avicularia; *b* — broto; *c* — sacco compensatorio; *e* — embryão primario; *n* — apparelho nutritivo em degeneração; *o* — ovo; *p* — operculo; *s* — embryões secundarios; *t* — tubo adhesivo; *v* — vibracula.

mento do novo broto *(b)*. Tratando-se, como foi dito, nessa degeneração periodica, duma intoxicação parcial, que não influe nos restantes tecidos viventes do individuo, p. ex. os phagocytos já mencionados, continuam elles em pleno vigor. Assim produz o tecido da parede do estojo, alimentado pelos individuos visinhos da colonia, um novo apparelho digestivo, com tentaculos, bocca, anus e centro nervoso. Em varias especies, o intestino cresce em redor do corpo bruno, até que este esteja incorporado ao primeiro, para então ser eliminado pelo novo anus.

A plasticidade dos processos gemmiferos na vida dos Bryozoarios manifesta-se distinctamente em condições artificiaes. Quando uma colonia que incrusta pedras ou algas, estiver desprendida do seu substrato habitual e suspensa livremente por meio de um fio, na agua (Fig. 6), desenvolvem-se na margem da colonia brotos de forma estranha. São tubos *(t)*, muitas vezes sem abertura, tentaculos e intestinos ou sómente vestigios rudimentares dessas formações normaes. Curvam-se esses tubos para baixo, mostrando, portanto, tendencia para attingir um novo substrato. Chama-se geotropismo positivo tal crescimento, na linguagem scientifica da Physiologia comparativa. Geotropismo positivo é o crescimento que é dirigido pela gravidade e segue a direcção da actividade dessa força. Quando os tubos se agarram ao sólo do aquario, tornam-se elles individuos com todos os caracteres da especie em questão; e por meio de gemmação regular originam-se cada vez mais animaes typicos. A irritação causada pelo contacto resulta portanto, não sómente numa producção de brotos normaes, mas tambem numa transformação ulterior dos tubos adhesivos. Apparentemente a irritação provocada por um substrato é sobreposta á irritação emanante da gravidade. Em terminologia physiologica diriamos que o thigmotropismo dos tubos adhesivos, í. é o seu crescimento para obterem novamente um substrato apropriado, é mais intensivo que o geotropismo. Evidencia-se isso por arquearem-se muitas vezes os tubos na margem da colonia suspensa na agua. Taes tubos attingem, desse modo, o plano inferior da colonia, o qual é coberto assim com individuos normaes. Resulta uma colonia de duas camadas de individuos, cujas paredes posteriores se tocam, embora dessa maneira nunca cresça normalmente a especie em questão.

Em opposição aos movimentos lentos descriptos, ao crescimento dirigido geotropicamente ou thigmotropicamente, são inorientados os movimentos rapidos, executados por certos individuos transformados. As cerdas das vibraculas (Fig. 7, *v)* agitam-se numa colonia normal, continua e rythmicamente. Repousam durante mais ou menos 140 segundos, em posição transversal, sobre as paredes posteriores dos animaes communs. Dahi vibra a cerda para cima e para fóra, até attingir

posição perpendicular, i. é parallela á margem da colonia. Em seguida varre a cerda o lado anterior da colonia até ficar estendida transversalmente, para depois voltar, pela mesma via, á posição de descanço. O movimento inteiro dura, na temperatura de 20° C, em média 8 segundos. Tocando-se a cerda com a ponta duma agulha, tal experiencia não produz effeito algum; ao passo que a irritação da parede anterior ou posterior de individuos communs resulta numa acceleração nas successões dos movimentos das cerdas. Sem poder entrar em pormenores sobre a correlação entre a intensidade e frequencia dos estimulos com a promptidão da sequencia dos movimentos reflexos, e a continuação depois da cessação das irritações, podemos resumir o seguinte: Ao irritar qualquer superficie da colonia, dá-se o mesmo movimento das cerdas acima descripto, realisando-se no mesmo tempo; mas são abreviados os intervallos de descanço, durando, na temperatura citada, até dez segundos apenas. Sendo fixos os movimentos, manifestações dum mecanismo pre-estabelecido, é indifferente a localisação do estimulo quanto á modalidade da vibração da cerda. São elles, em terminologia physiologica, reflexos inorientados, como o é a reacção da anemona do mar (actinia), que se contrae quando irritada, seja na bocca ou na extremidade basal.

Num outro typo de individuos transformados, nas avicularias (Figs. 3, 7, *a*), provoca o mesmo estimulo dois reflexos differentes. São as avicularias animaes que, como as vibraculas, têm a funcção de proteger a colonia contra incrustações de limo ou animaes sesseis. Em especies não providas de vibraculas agitam-se as avicularias, em geral com bico aberto, principalmente para o lado anterior da colonia. Intercorrendo p. ex. um vermiculo entre as laminas do bico da avicularia, a mandibula movel aboca-o e segura-o pelo menos durante muitas horas. No mesmo momento em que se entala na mandibula um corpo heterogeneo, talvez a ponta duma agulha ou um cabello, fica interrompido o movimento da avicularia. Emquanto a mandibula não prender alguma coisa, é autonoma a avicularia no tocante a seu vibrar ou repousar, e no entanto a mandibula póde abrir-se ou fechar-se sem parar o movimento geral da avicularia. Unicamente o estimulo provocado por esse corpo estranho realisa a coincidencia dos dois reflexos: o fechamento da mandibula e a parada do movimento da avicularia inteira.

ABSTRACT

A description of the evagination of the polypide in forms with a membranous frontwall (Anasca) and in such with a calcareous one (Ascophora) is given. The question of auto-fecundation, the genital

pore, the inter-tentacular organ and the passage of the egg into the ovicell are mentioned. The formation of the «brown body», the budding of attachment-zooecia under experimental conditions and the effects of mechanical stimulation of the vibracula and avicularia are dealt with.

BIBLIOGRAPHIA

GERWERZHAGEN, A. — 1913 — Untersuchungen an Bryozoen, vorläufige Mitteilung: Sitz. Ber. Heidelberg. Akad. Wissensch. math.-naturwissensch. Klasse, Abtlg. B, Biolog. Wissensch., Jahrg. 1913, **9**, Heidelberg.

HARMER, S. F. — 1892 — On the nature of excretory processes in marine Polyzoa: Quart. Journ. micr. Sc. (n. ser.), **33**, 123-167, tab, 2, 3. London.

HARMER, S. F. — 1901 — On the Structure and Classification of the Cheilostomatous Polyzoa: Proc. Cambridge Philos. Soc., **11**, 11-17, Cambridge.

HARMER, S. F. — 1902 — On the Morphology of the Cheilostomata: Quart. Journ. micr. Sc. (n. ser.), **46**, 263-350, tab. 15-18. London.

JULLIEN, J. — 1888 — Sur la sortie et la rentrée du polypide dans les zooecies dans les Bryozoaires Cheilostomiens Monodermiés: Bull. Soc. Zool. France, **13**, 67-68. Paris.

JULLIEN, J. — 1888 — Observations anatomiques sur les Caténicelles: Mém. Soc. Zool. France, **1**, 274-280, tab. 11. Paris.

MARCUS, E. — 1926 — Bryozoa em: Grimpe, G. & Wagler, E., Die Tierwelt der Nord- und Ostsee, Teil VII c, Leipzig.

MARCUS, E. — 1926 — Beobachtungen und Versuche an lebenden Meeresbryozoen: Zool. Jahrb. (Abtlg. Syst.), **52**, 1-102 tab. 1, 2. Jena.

———o———

BIOLOGIA DO NEMATOIDE "PROCAMALLANUS CEARENSIS" n. sp.

POR

C. Pereira, M. Vianna Dias e P. de Azevedo

Trabalho em collaboração do Instituto Biologico de S. Paulo com a Commissão Technica de Piscicultura do Nordeste

Com 8 figuras no texto e estampas 30-33

Em Julho do corrente anno, no decorrer dos trabalhos a que procedem actualmente os technicos da Commissão Technica de Piscicultura, em Fortaleza, Estado do Ceará, para criação artificial de *Curimatus elegans* STEINDACHNER, vulgarmente conhecido por «saguirú» no sul do Brasil e por «piabussú», no local, foi notado que os alevinos do referido peixe se encontravam parasitados frequentemente por larvas de um pequeno nematoide. Por outro lado, a alimentação dos alevinos em questão consistia em um plankton constituido por Algas, Protozoarios, Rotiferos e Microcrustaceos, salientando-se entre estes ultimos os do genero *Diaptomus* WESTWOOD, 1836, colhidos na lagôa de Tauápe, situada nas proximidades do laboratorio da C. T. P., e que fornecia toda a quantidade necessaria de *D. cearensis* WRIGHT, 1936, para a alimentação dos alevinos.

Feita a observação do parasitismo nos alevinos, tentamos pesquizar um possivel parasitismo previo dos exemplares de *Diaptomus* pelo nematoide em estudo, tendo sido felizes em nossas tentativas, pois verificamos que cerca de $2\,^0/_{00}$ dos *Diaptomus* apanhados nas lagôas de Tauápe, Soure e Porangaba, todas nas proximidades de Fortaleza e representados por *D. cearensis* WRIGHT, 1936, e *D. azevedoi* WRIGHT, 1935, se achavam parasitados por um pequeno nema, presente apenas e nunca mais de um exemplar em cada microcrustaceo.

Todo o material colhido, bem como abundante collecta de helminthos parasitos de peixes das lagôas de Tauápe, Soure, Baixa Verde, açude Henriqueta e rio Cocó, sempre em aguas cearenses, foi devidamente estudado para a detecção das phases de evolução do nema.

De todo esse material, tudo quanto se referia ao nema parasito dos alevinos e pôde ser encontrado em suas principaes phases evolutivas, foi cuidadosamente seleccionado para o presente trabalho; seu estudo revelou constituir uma especie nova do genero *Procamallanus* BAYLIS, 1923, do qual daremos a descripção em primeiro lugar.

Deixamos aqui expressos nossos agradecimentos ao Dr. W. C. FRANÇA, efficiente e prestimoso auxiliar, a quem devemos o primeiro encontro de um exemplar de *Diaptomus* parasitado.

Procamallanus cearensis n. sp.

Figuras 1-7 e estampas 30-33

Helminthos de côr avermelhada, pequenos.

Machos: comprimento, cerca de 4 mm.; espessura, approximadamente 0,18 mm. Cuticula com estriação transversal discreta.

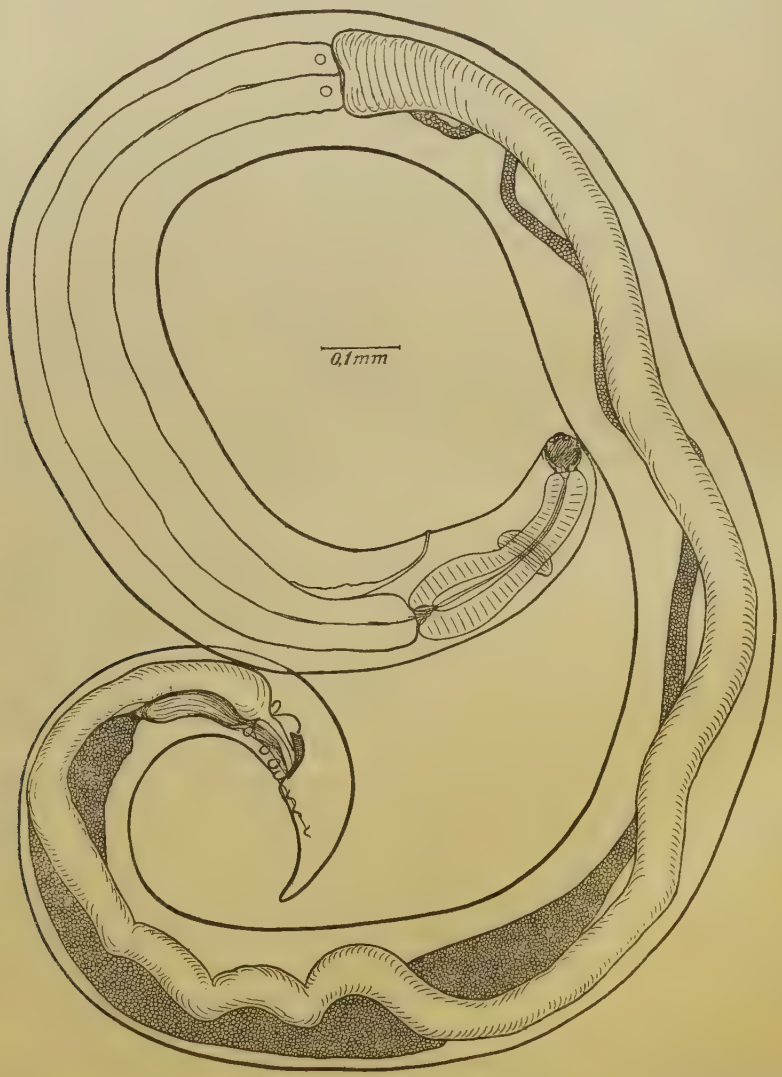


Fig. 1 — Macho de *Procamallanus cearensis* n. sp., obtido do intestino *Astyanax bimaculatus vittatus* Castelnau: desenho total.

Extremidade anterior com bocca circular dando entrada a ampla capsula buccal de forma globosa, cuja parede é revestida por cerca de 18 estrias chitinosas mais espessas na base e que se afilam progressivamente á medida que se extendem para a frente e para a esquerda, terminando sem attingir o rebordo buccal; capsula buccal medindo cerca de 0,04 mm. de diametro; esophago claviforme, medindo cerca de 0,27 mm. de comprimento; entre o esophago e a capsula buccal existe um vestibulo com forma de annel chitinoso, sobre o qual se apoia a capsula buccal e que mede approximadamente 0,008 mm. de altura; ventriculo glandular medindo cerca de 1,03 mm. de comprimento, apresentando como de costume 2 volumosos nucleos proximo de sua extremidade posterior. Annel nervoso a cerca de 0,16 mm. da extremidade anterior. Poro excretor situado a 0,20 mm., da extremidade anterior.

Extremidade posterior com tendencia a se enrolar ventralmente e afilada de maneira brusca, provida de delgadissimas azas caudaes; abertura da cloaca a cerca de 0,15 mm. da extremidade posterior; dois espiculos curtos, sub-iguaes, bem chitinizados e de facil observação, medindo cerca 0,057 mm. de comprimento. Face ventral exhibindo musculos obliquos muito nitidos e apresentando 7 pares de papillas dispostas em 2 linhas sub-lateraes, sendo 4 pares pre-cloacaes e 3 pares post-cloacaes.

Femeas: comprimento variavel entre 10,3 e 14 mm.; espessura comprehendida entre 0,28 e 0,42 mm. Cuticula com estriação transversal discreta.

Apparelho digestivo analogo ao dos machos; capsula buccal medindo cerca de 0,04 a 0,05 mm. de diametro e provida de cerca de 18 estrias chitinosas parietaes; esophago medindo de 0,37 a 0,39 mm. de comprimento; ventriculo medindo de 1,75 a 1,93 mm. de comprimento. Annel nervoso situado de 0,12 a 0,16 mm. da extremidade anterior. Poro excretor entre 0,21 e 0,26 mm. da extremidade anterior. Anus de 0,08 a 0,14 mm. da extremidade posterior.

A extremidade posterior termina afilando-se rapidamente.

Vulva situada de 6,3 a 6,4 mm. da extremidade posterior; uteros divergentes; falta de desenvolvimento do ovario posterior. Viviparas.

Hospedeiros:

Adultos: intestino delgado de *Astyanax bimaculatus vittatus* Castelnau, 1855.

Larvas de 1.º e 2.º estadio: cavidade geral de *Diaptomus cearensis* Wright, 1936 e *D. azevedoi* Wright, 1935.

Larvas de 2.º e 3.º estadio: alevinos de *Curimatus elegans* Steindachner.

Localidade:

Lagôas Tauápe, Soure e Porangaba. Fortaleza (Ceará, Brasil).

Esta especie é extremamente affim de *P. wrighti* Pereira, 1935 com a qual chegamos mesmo a confundil-a a principio, distinguindo-se della entretanto pelo maior comprimento do ventriculo nos dois sexos, pelo menor numero de papillas post-cloacaes da cauda do macho, pela maior chitinização dos espiculos, bem como por seu maior tamanho. Os caracteres differenciaes em relação a *P. rarus* Travassos, Artigas e Pereira, 1928, a *P. inopinatus* Travassos, Artigas e Pe-

REIRA, 1928 e a *P. hilarii* VAZ e PEREIRA, 1935 permanecem os mesmos estabelecidos para distinguir *P. wrighti*.

Cyclo evolutivo de *Procamallanus cearensis*.

As femeas adultas deste nematoide, habitante do intestino delgado do pequeno peixe *Astyanax bimaculatus vittatus* CASTELNAU, vulgarmente conhecido por «lambary» no sul e «piaba» no norte do Brasil, pertencente á sub-familia *Tetragonopterinae* G. da familia *Characididae* MUELLER, são viviparas. Devido á falta de desenvolvimento do ovario posterior, só ha formação de ovos anteriormente, os quaes á medida que entram para o utero, vão soffrendo segmentações successivas, que os conduzem á constituição de larvas. Estas, á medida que adquirem mobilidade, põem-se a percorrer o utero materno em todos os sentidos, ora accumulando-se mais em certos niveis do orgam, sem um determinismo perceptivel; em geral tendem a se accumular no ramo posterior do utero, inclusive no ovejector do ovario atrophico; no utero completamente cheio encontram-se larvas enrodilhadas ou extendidas em todos os sentidos, sem ordem apparente; o orgam plenamente desenvolvido attinge anteriormente a extremidade posterior do esophago, chegando a mascarar completamente o ventriculo, e posteriormente chega até o nivel do anus. Não foi possivel verificar como se dá a sahida das larvas do organismo materno.

Entretanto, é interessante assignalar o facto de que, ás vezes, o simples peso da laminula sobre a femea madura é capaz de determinar a ruptura da parede do corpo, o que põe as larvas em liberdade.

Comprimento variavel entre 0,46 e 0,56 mm.; espessura, cerca de 0,03 mm. Cuticula com estriação transversal nitida.

Extremidade anterior truncada, bocca apparentemente simples; ausencia de capsula buccal e de qualquer apparelho perfurador; a luz esophageana se continúa simplesmente até terminar no delicado orificio buccal; dorsalmente, á extremidade anterior, existe uma eminencia conica que LEUCKART tambem notou nas larvas de *Camallanus lacustris* (ZOEGA, 1776) e que devido á sua mais accentuada chitinização, achou poder corresponder a um apparelho perfurador *(Bohrapparat)*, ao qual chega mesmo posteriormente a dominar *Bohrzahn;* TOERNQUIST, ao referir as observações de LEUCKART, diz simplesmente: «Die Larven sind dorsal von der Mundoeffnung mit einem Bohrzahn versehen». Parece-nos que esta formação não merece tal nome, pois, como bem accentuou LEUCKART, as larvas penetram passivamente no hospedeiro intermediario. Por outro lado, a manutenção de tal nome poderia originar confusão com o «estylete» buccal de certos nematoides, de origem e significado completamente differentes, pelo que será mais prudente denominar tal eminencia dorsal da extremidade anterior simplesmente «papilla dorsal», denominação que não envolve um finalismo discutivel; esophago flacido, approximadamente cylindrico, me-

dindo de 0,10 a 0,11 mm. de comprimento; intestino simples; anus situado de 0,21 a 0,22 mm. da extremidade posterior; cauda relativamente muito longa, attingindo cerca de 40 a 45 % do comprimento total do corpo, afilando progressivamente até terminar em ponta muito fina.

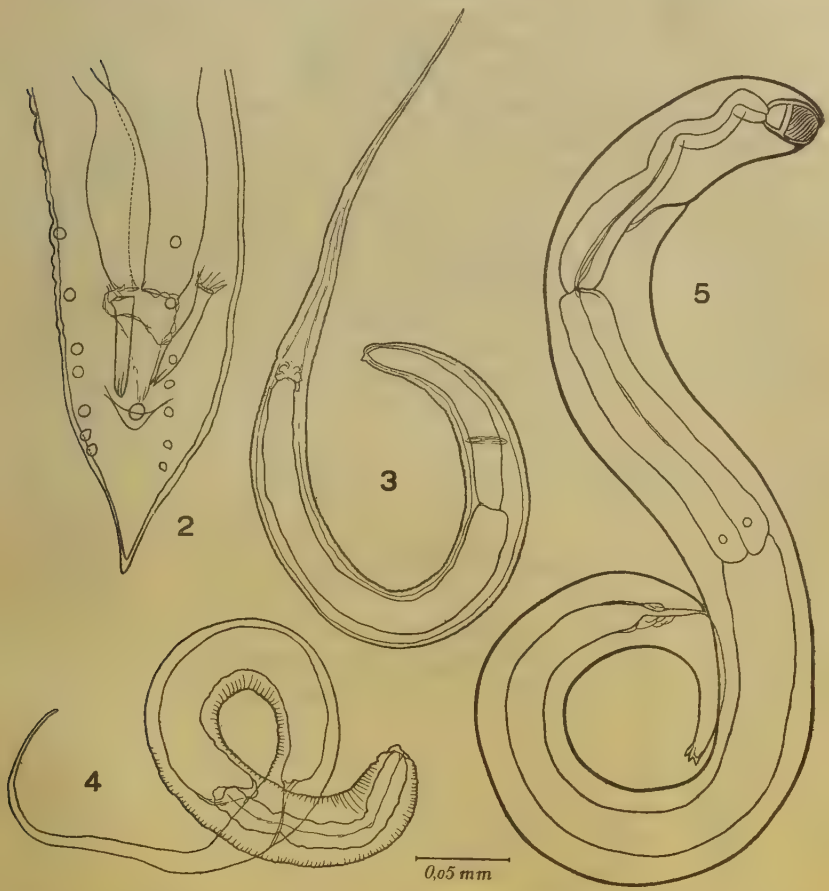


Fig. 2 — *Procamallanus cearensis, n. sp.* obtido do intestino de um alevino de *Curimatus elegans* Steindachner, com 23,7 mm. de comprimento total: cauda vista de frente. Fig. 3 — *Idem:* larva do 1.º estadio, retirada do utero de uma femea madura, obtida do intestino de *A. bimaculatus vittatus.* Fig. 4 — *Idem:* larva do 1.º estadio, obtida da cavidade geral de *Diaptomus cearensis* Wright. Fig. 5 — *Idem:* larva do 2.º estadio, obtida da cavidade geral *D. cearensis.*

Estas larvas podem ser retiradas do utero materno e levadas para a agua doce, onde permanecem muito bem por muitos dias; não

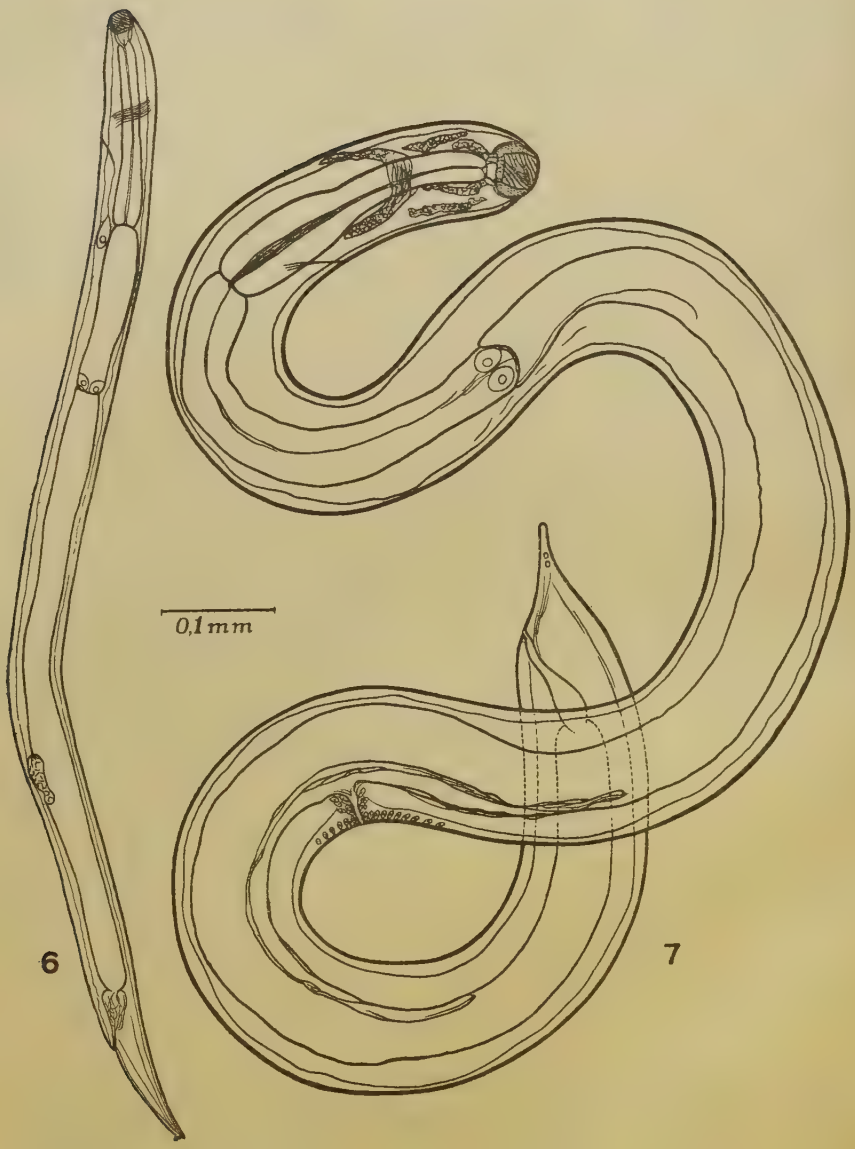


Fig. 6 — *Procamallanus cearensis:* larva do 3.º estadio, obtida do intestino de um alevino de *Curimatus elegans* Steindachner, medindo 14 mm. de comprimento total. Fig. 7 — *Idem:* larva do 3.º estadio, obtida do intestino de um alevino de *Curimatus elegans*, medindo 16, 2 mm. de comprimento total.

observamos a sobrevida maxima destas larvas, porém é possivel que, á semelhança das larvas de *C. lacustris* observadas por LEUCKART, ella possa extender-se tambem a varias semanas.

Collocadas n'agua, as larvinhas cáem lentamente para o fundo, onde permanecem e frequentemente se prendem pela extremidade caudal aos detrictos que ahi encontram, apresentando-se entretanto sempre moveis, com o resto do corpo em agitação contínua.

Em uma pequena cuba de vidro foram collocadas varias larvas retiradas do utero materno; pouco depois, juntou-se a essa agua um pequeno numero de *Diaptomus cearensis* que, previamente examinados, se haviam revelado isentos de parasitismo por nemas. Estes microcrustaceos ingerem as pequeninas larvas, facto que já tinha sido posto em evidencia por LEUCKART para as larvas de *C. lacustris* e por ISSAJEW para as larvas de *Fuellebornius medinensis* (L., 1758) LEIPER, 1926, ambos trabalhando com copepodos do genero *Cyclops*.

Posteriormente conseguiu-se tambem infestar experimentalmente *D. azevedoi,* apresentando-se 4 % dos exemplares desta especie, infestados com larvas de *P. cearensis*, apresentando um delles, depois de 20 horas de exposição, duas larvas na cavidade geral.

Não tivemos opportunidade de verificar por quanto tempo podem as larvas permanecer vivas no hospedeiro intermediario, devendo ellas provavelmente apresentar uma sobrevida muito longa, pois sua situação na cavidade geral do microcrustaceo previne a possibilidade de serem eliminadas para o meio exterior; por outro lado, nunca foi possivel observar diminuição da vitalidade das larvas nem qualquer reacção do microcrustaceo, tendente a destruil-as. Aliás, o parasitismo parece ser perfeitamente tolerado pelos *Diaptomus,* que exhibem um comportamento apparentemente igual ao dos crustaceos não parasitados. A falta de reacção ao parasito é de tal ordem, que este nem mesmo fica encystado no organismo do microcrustaceo, permanecendo livre e movel, podendo deste modo ser encontrado nos mais diversos lugares da cavidade geral do seu hospedeiro intermediario.

Em cada exemplar de *Diaptomus* foi encontrada sempre uma unica larva de *Procamallanus*. Não temos entretanto elementos para saber se a presença de um unico parasito corre por conta de um processo analogo ao da premunição ou se, mais provavel e simplesmente, a existencia de um unico parasito em cada microcrustaceo decorre apenas das poucas probabilidades que tem este de se infestar, para o que é necessario ir-se alimentar no fundo da agua em que vive ou, pelo menos, sobre um supporte no qual estacionem as larvas do nema em sua queda para o fundo. O que é mais verosimel e estaria de accordo com o com-

portamento vagabundo dos *Diaptomus,* que geralmente ficam proximos á superficie das aguas, é que estes se atirem sobre as larvinhas cadentes, engulindo-as portanto no decorrer de sua queda para o fundo. Este modo de interpretar estaria de accordo com a experiencia já citada de LEUCKART, que conseguiu infestar seus *Cyclops,* em ambiente limitado até com um maximo de 34 larvas de *Camallanus.*

Desta difficuldade de infestação resultariam não só as maiores probabilidades do *Diaptomus* se infestar uma só vez antes de vir a ser devorado por um animal entomostracophago, bem como a fraca porcentagem de microcrustaceos parasitados naturalmente, que é de cerca de $2\,^0/_{00}$, disso decorrendo o facto de só encontrarmos habitualmente um unico parasito de cada vez.

Posteriormente, verificamos a possibilidade de super-infestar experimentalmente os microcrustaceos. Tomando-se um exemplar de *D. cearensis* infestado naturalmente com uma larva do 2.º estadio de *P. cearensis,* foi elle posto em contacto com numerosas larvas do 1.º estadio do nema; ao fim de 24 horas a situação não mudou, mas ao cabo de dois dias o microcrustaceo se apresentava superinfestado com mais duas larvas do 1.º estadio, o que veiu confirmar nossa hypothese anterior.

Já referimos que as especies de *Diaptomus* encontradas parasitadas em natureza são *D. cearensis* na lagôa Tauápe e *D. azevedoi* na lagôa de Soure. Dada entretanto a conhecida fraqueza da especificidade do parasitismo nesta phase de evolução da maior parte dos nemas heteroxenos, é bem provavel que outras especies do mesmo genero, taes como, ainda no Ceará, o *D. iheringi* WRIGHT, 1935, muito affim de *D. cearensis,* possam desempenhar o mesmo papel no cyclo evolutivo do *Procamallanus cearensis,* bem como no cyclo evolutivo de outras especies do mesmo genero e de generos proximos, não tendo a mesma importancia pratica, provavelmente por constituirem minoria insignificante em relação á quantidade grande de *D. cearensis.*

Particularmente no sul do paiz e notadamente no estado de S. Paulo, onde já foram descriptas varias especies do genero *Procamallanus* parasitando peixes de aguas, algumas das quaes, como verificou recentemente S. WRIGHT, particularmente pobres ou mesmo desprovidas de representantes do genero *Diaptomus,* mas onde frequentemente se encontram especies do genero *Cyclops,* talvez seja este genero que contribúa com os hospedeiros intermediarios necessarios á evolução das especies locaes do genero *Procamallanus.*

Dada a ingestão das larvas de *Procamallanus* pelo *Diaptomus,* estas atravessam activamente a parede do tubo digestivo do micro-

crustaceo, indo, como já assignalamos, localizar-se na cavidade geral do hospedeiro, onde permanecem sem se encystar.

Se as larvas são capazes de permanecer na agua por espaço de algumas semanas sem apresentar modificações sensiveis, o mesmo não acontece na cavidade geral do hospedeiro onde, em cerca de 3 dias, effectúam a primeira ecdyse, facto cujo processo não pudemos observar directamente mas sobre o qual as differenças morphologicas apresentadas pelos varios parasitos encontrados em *Diaptomus* nos fornecem uma documentação indiscutivel.

Descripção das larvas de P. cearensis retiradas da cavidade geral de Diaptomus cearensis e D. azevedoi.

1.º typo

Morphologia e dimensões comparaveis ás das larvas retiradas do utero de femeas de *P. cearensis*. Foram encontradas duas larvas deste typo, ambas em *D. cearensis*. Dimensões do unico exemplar medido (fig. 4): comprimento 0,53 mm.; espessura 0,04 mm.; comprimento do esophago 0,11 mm.; comprimento da cauda 0,21 mm.

2.º typo

Comprehende a maior parte das larvas encontradas em *D. cearensis* e *D. azevedoi*. Os factos mais salientes que servem para caracterizar este typo de larvas são os seguintes. Comprimento comprehendido entre 0,66 a 0,76 mm.; espessura variavel entre 0,03 e 0,04 mm. Apparecimento da capsula buccal de mesma organização que a do adulto, apenas com menor numero de estrias chitinosas diagonaes da parede da capsula, isto é, cerca de 9 a 10 apenas; dimensões da capsula 0,016 por 0,020 mm. de diametro. Entre a capsula buccal e o inicio do esophago surge um vestibulo de forma afunilada, intimamente ligado á capsula buccal, de tal modo que quando um traumatismo arranca a capsula, esta traz comsigo o vestibulo; este mede 0,012 mm. de profundidade. Differencia-se o esophago muscular claviforme, que mede de comprimento 0,14 mm.; este se continúa com o ventriculo glandular, cylindrico, medindo cerca de 0,12 a 0,13 mm. de comprimento, terminando por 2 cellulas providas de nucleos gigantes. Intestino rectilineo, conduzindo a um recto relativamente curto, o qual termina no anus, situado a 0,073 mm. da extremidade posterior. Cauda relativamente curta, terminada bruscamente em 3 ou 4 pequeninas pontas.

Não foram notados esboços das gonadas.

Larvas de P. cearensis retiradas do intestino de alevinos de Curimatus elegans.

As larvas encontradas no intestino dos alevinos de saguirú apresentam accentuada diversidade de dimensões, correspondendo entretanto as menores muito sensivelmente ás dimensões e organização do 2.º typo de larvas encontrado nos microcrustaceos do genero *Diaptomus* (fig. 5), igualmente sem esboço de gonadas.

O primeiro esboço de gonadas foi observado em uma larva de femea medindo cerca de 1,0 mm. de comprimento; era constituido por um conjuncto cellular um tanto alongado, medindo cerca de 0,04 mm. de extensão, distando da extremidade posterior 0,32 mm. (fig. 6). A primeira individualização de ovejector foi observada em uma larva medindo 1,9 mm. de comprimento, estando esta formação a cerca de 0,84 mm. da extremidade posterior, conseguindo-se ver muito nitidamente o referido esboço na fig. 7, de um exemplar medindo 2,4 mm. de comprimento.

Quanto ao apparelho digestivo, notam-se os seguintes factos: a capsula buccal apresenta suas estriações caracteristicas em numero variavel entre 8 e 11; excepcionalmente uma larva de femea apresentou 14 estrias, ao passo que o unico macho encontrado evidenciou cerca de 15; as dimensões relativas do esophago e do ventriculo se mantêm approximadamente no mesmo nivel, podendo-se entretanto notar nas formas mais curtas, com poucas excepções, certa tendencia do esophago em ser maior que o ventriculo, ao passo que, á medida que se processa o crescimento da larva, o ventriculo tende a se tornar um pouco maior que o esophago, ao mesmo tempo que se nota um crescimento mais accentuado do comprimento total da larva, o que acarreta uma diminuição relativa das dimensões do esophago e do ventriculo quando comparadas com o comprimento das larvas.

Em um alevino de 23 mm. de comprimento foi encontrado um exemplar macho, ainda novo, apresentando todos os attributos especificos, o que permittiu facil identificação (fig. 2). Estava em um estadio de desenvolvimento evidentemente mais avançado que as larvas de femeas encontradas no mesmo material.

Dimensões em mm. das larvas de *P. cearensis*, retiradas do intestino de alevinos de *Curimatus elegans*.

				♀	♀	♀	♀	♀	♀	♂
Comprimento	0,82	0,84	0,90	1,0	1,25	1,57	1,95	2,06	2,42	2,26
Espessura	0,04	0,08	0,04	0,04	0,05	0,08	0,08	0,11	0,10	0,10
Capsula buccal — dimensões	?	0,020	0,016	0,016	0,016	0,016	0,032	0,024	0,032	0,041
Capsula buccal — dimensões	?	0,024	0,024	0,020	0,020	0,024	0,037	0,032	0,041	0,049
Capsula buccal — n.º de estrias	?	∓ 9	± 9	± 9	± 9	± 12	± 14	± 12	± 14	± 15
Vestibulo	?	0,016	0,012	0,010	0,012	0,016	0,008	0,016	0,016	0,008
Esophago	0,18	0,16	0,18	0,16	0,18	0,22	0,24	0,22	0,24	0,28
Annel nervoso	?	?	?	0,09	?	?	0,12	0,12	0,12	?
Ventriculo	0,16	0,15	0,16	0,14	0,18	0,24	0,32	0,28	0,32	0,40
Póro excretor	0,078	?	0,082	0,10	0,12	0,12	0,14	0,18	0,20	?
Cauda — comprimento	0,08	0,08	0,10	0,09	0,09	0,06	0,10	0,10	0,10	0,08
Cauda — terminação	4 pontas	4 pontas	4 pontas	4 pontas	3 pontas	—	1 ponta	truncada	truncada	—
Esboço de gonadas	—	—	—	0,04	0,09	existe	existe	existe	existe	complet. constituido
Dist. da vulva á extr. posterior	—	—	—	falta vagina 0,32	falta vagina 0,35	?	falta vagina 0,84	?	0,88	—
Espiculos	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,057
Papillas pre-anaes	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,062 4 pares
Papillas post-anaes	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3 pares

Exemplares adultos de P. cearensis, parasitando o intestino de Astyanax bimaculatus vittatus.

Os especimens de *A. bimaculatus* provenientes da Lagôa Tauápe, pequeno «lambary» (localmente denominado «piava» ou «piavinha»), mediam de 30 a 35 mm. de comprimento. Seus parasitos achavam-se todos bem maduros, o que não permittiu o exame detalhado do apparelho genital feminino. Dada, entretanto, a extrema semelhança de organização com o *P. wrighti,* onde esse estudo foi possivel, é de crer que tenhamos, na especie em questão, os mesmos factos fundamentaes observados no estudo do *P. wrighti.*

Dimensões em mm. dos exemplares adultos de *P. cearensis:*

	♀	♀	♀	♀	♂
Comprimento	10,34	13,22	13,6	14,03	4,06
Espessura	0,28	0,42	0,36	0,38	0,18
Capsula buccal — dimenções	0,049	0,049	0,045	0,045	0,041
	0,053	0,053	0,049	0,050	0,045
Capsula buccal — n.º de estrias	± 18	± 18	± 18	± 18	± 18
Vestibulo	0,012	0,012	0,012	0,012	0,008
Esophago	0,39	0,39	0,38	0,37	0,27
Annel nervoso	0,16	0,16	0,12	0,12	0,16
Ventriculo	1,75	1,87	1,90	1,93	1,03
Poro excretor	0,24	0,21	0,26	0,22	0,20
Cauda	0,08	0,11	0,13	0,14	0,15
Dist. da vulva á extr. posterior.	?	6,47	6,36	6,31	—
Desenvol. do apparelho genital	muitas larvas no utero	muitas larvas no utero	muitas larvas no utero	muitas larvas no utero	—
Espiculos	—	—	—	—	0,057
Papillas pre-anaes	—	—	—	—	4 pares
Papillas post-anaes	—	—	—	—	3 pares

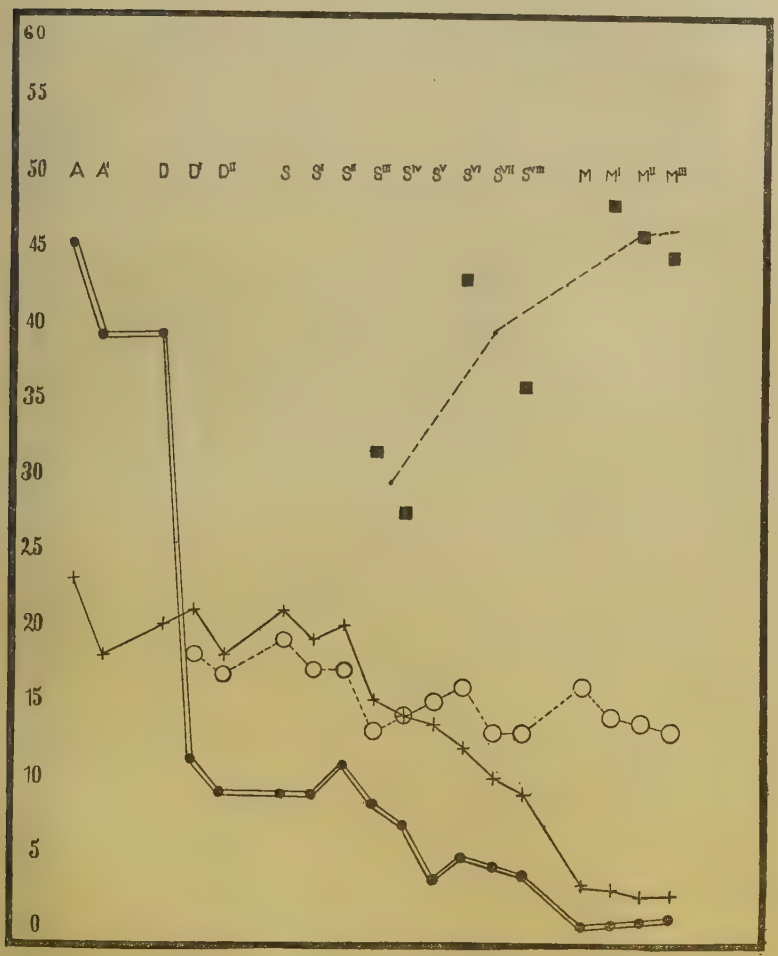


Fig. 8 — *P. cearensis:* Graphico representando os comprimentos relativos, expressos em porcentagens do comprimento do corpo, de: comprimento da cauda (circulos cheios); comprimento do esophago (+); comprimento do ventriculo (circulos vasios): distancia da vulva á extremidade posterior (quadrados cheios). Exemplares representados: letra A — larvas retiradas da cavidade geral de *Diaptomus cearensis;* pela letra S — larvas retiradas do intestino de alevinos de *Curimatus elegans;* pela letra M — adultos, retirados do intestino de *Astyanax bimaculatus vittatus.*

DISCUSSÃO

O estudo comparativo das dimensões e morphologia de todos exemplares de *Procamallanus cearensis* por nós estudados, permitte-nos traçar as linhas geraes de seu desenvolvimento morphologico, as quaes, convenientemente conjugadas com os varios typos de hospedeiros por nós encontrados em relação com os differentes achados helminthologicos, bem como com o conhecimento das principaes caracteristicas ecologicas, tanto do nema como de seus varios hospedeiros, foram de molde a nos conduzir a uma interpretação conveniente do cyclo evolutivo deste *Camallanoidea.*

Para melhor poder comparar as dimensões dos varios exemplares encontrados no decorrer de nossas pesquizas, usamos o artificio de fazer todos os comprimentos do corpo iguaes a 100 e, em seguida, seleccionamos as dimensões mais caracteristicas que passamos a expressar em funcção de 100, isto é, em porcentagens do comprimento do corpo de cada exemplar; fizemos esta transformação de medidas apenas com as femeas, por constituirem o material mais abundante e por isso se prestar melhor para um estudo desta natureza. Os resultados obtidos estão condensados no graphico da fig. 8, onde a ordem dos exemplares obedeceu a agrupamentos por hospedeiros, e, em cada grupo, a tamanhos do corpo crescentes da esquerda para a direita. Deste modo, conseguimos fazer resaltar nitidamente todas as alterações de dimensões relativas da cauda, do esophago, do ventriculo e da distancia da vulva á extremidade posterior do animal, capazes de nos evidenciar as varias ecdyses soffridas pelo nema em seu desenvolvimento.

Larvas de 1.º estadio. — Encontram-se no utero da femea adulta e, sahidas para o meio exterior, vão constituir a phase infestante passiva, para *Diaptomus cearensis* WRIGHT, 1936 e *D. azevedoi* WRIGHT, 1935, possivelmente mesmo para outras especies do mesmo genero ou de generos affins, do que ha evidencias de ordem zoogeographica anteriormente assignaladas. Engulidas pelo microcrustaceo, as larvas atravessam a parede de seu tubo digestivo, indo localizar-se na cavidade geral do corpo do hospedeiro intermediario. Estas larvas já foram descriptas previamente (pag. 217) e se caracterizam grosseiramente por apresentarem uma cauda excessivamente longa e delgada, medindo cerca de 40 a 45 % do seu comprimento total. Soffrem uma 1.ª ecdyse, transformando-se em:

Larvas do 2.º estadio. — Estas larvas, já descriptas juntamente com as de 1.º estadio, são encontradas na cavidade geral dos microcrustaceos que são os hospedeiros intermediarios, no caso, as

especies de *Diaptomus* acima assignaladas; constitúem a phase infestante para os peixes entomostracophagos. Neste estadio evolutivo, os phenomenos mais salientes são a queda brusca das dimensões relativas da cauda, que passa a representar apenas cerca de 10 % do comprimento total da larva, e o comprimento do esophago, representado por cerca de 20 % do comprimento total, ao passo que o ventriculo é ligeiramente mais curto que elle. Quando o microcrustaceo é devorado por um peixe entomostracophago, no caso, os alevinos de *Curimatus elegans,* vulgarmente conhecido por «piabussú» no nordeste do paiz ou por «saguirú» no Estado de S. Paulo, pequeno *Characinidae* da subfamilia *Curimatinae,* as referidas larvas se installam na porção inicial do intestino delgado do novo hospedeiro, onde soffrem uma 2.ª ecdyse, transformando-se em:

Larvas do 3.º estadio. — Nestas, os primeiros esboços de gonadas que já tinham apparecido no estadio anterior crescem mais, as cristas da capsula buccal, que no estadio anterior eram ± 9, passam a ser de cerca de 12 a 15; a cauda, que era provida de pontas, passa a ser simplesmente truncada, e as dimensões relativas do esophago se tornam menores que as do ventriculo, reduzindo-se a cauda ainda um pouco mais, após o que, deve-se passar uma 3.ª ecdyse, que conduz as larvas á phase de:

Larvas do 4.º estadio. — Não tivemos opportunidade de encontrar este typo de larvas, que provavelmente deve surgir no intestino delgado de *Astyanax bimaculatus vittatus, Characinidae* da subfamilia *Tetragonopterinae,* conhecido no Sul por «lambary» e no Nordeste por «piaba», quando este devorar os alevinos de «saguirú» infestados pelo nema. Finalmente, dá-se uma 4.ª ecdyse, da qual resultam as:

Larvas do 5.º estadio que, soffrendo o processo de maturação sexual, constituirão os nemas adultos já descriptos no começo deste artigo (pag. 210).

Foi esse o cyclo evolutivo que pudemos deslindar de toda a somma desordenada do material colhido.

Entretanto, merece ser discutido o papel representado neste cyclo pelos alevinos de «saguirú», que vimos infestarem-se com *P. cearensis,* ao devorar os *Diaptomus* contaminados. Nestes alevinos, o desenvolvimento do *Procamallanus* não vimos que fosse além do nivel de larva do 3.º estadio evolutivo; possivelmente poderia mesmo dar-se a transformação em larva do 4.º estadio, o que parece ser o caso do unico exemplar macho deste helmintho encontrado em um alevino de 23 mm. de comprimento. Por outro lado, a maturação sexual

só se processa no intestino de *Astyanax bimaculatus,* que deve, portanto, ser considerado como o hospedeiro definitivo e real do parasito.

Ora, o grande numero de «saguirús» adultos que já tivemos opportunidade de examinar na Parahyba, Rio Grande do Norte e Ceará, reunido ao abundante material já estudado no sul do paiz por TRAVASSOS, ARTIGAS e PEREIRA, bem como por VAZ e PEREIRA, permittenos chegar á conclusão de que o «saguirú» adulto é incapaz de se comportar como hospedeiro definitivo de especies do genero *Procamallanus;* entretanto, seus alevinos se infestam facilmente, facultando condições tão boas de vida ao helmintho, que até permittem a execução de ecdyses.

Ainda, as especies de *Procamallanus* já conhecidas em nosso meio revelam-se relativamente pouco especificas, podendo ser encontradas em um numero maior ou menor de hospedeiros, sempre carnivoros. Ora, este facto é o sufficiente para incluir entre os helminthos eurixenos de SEURAT as especies de *Procamallanus,* que, portanto, poderiam supportar certo gráo de desenvolvimento tambem no «saguirú», ao menos em suas phases juvenis. Este phenomeno não aconteceria mais nos adultos, em primeiro lugar pela provavel precariedade do parasitismo neste hospedador, em segundo, pela mudança de regimen alimentar do peixe, que passa de uma infancia entomostracophaga para um estado adulto limnophago, no qual perde a opportunidade de se infestar, por não comer mais os hospedeiros intermediarios reaes do parasito, constituidos pelos microcrustaceos.

Teriam elles importancia na disseminação de especies do genero *Procamallanus* em outros peixes carnivoros, phenomeno observado com grande frequencia pelos autores que têm estudado a fauna helminthologica dos peixes de agua doce, e tornado possivel pelo accentuado eurixenismo dos representantes deste genero.

Quanto ao hospedeiro definitivo, no caso o *Astyanax bimaculatus,* sendo elle, quando jovem, tambem entomostracophago como a generalidade dos alevinos de peixes, e só posteriormente mudando seu regimen alimentar para insectivoro e carnivoro, poderia infestar-se directamente ao comer os microcrustaceos nos seus primeiros tempos de existencia, passando depois a infestar-se atravez de segundos hospedeiros intermediarios, de grande importancia pratica no desfecho do parasitismo para os hospedeiros definitivos, porém de nenhuma significação real para as necessidades vitaes do parasito, o que é demonstrado pelo encontro de *A. bimaculatus vittatus* parasitados, quando apenas com 17 mm. de comprimento, isto é, cerca de um mez apenas de idade, e ainda incapazes de comer os alevinos de saguirú. Nestas condições, só podem ter-se infestado ao ingerir microcrustaceos parasitados.

Portanto, os alevinos de saguirú devem entrar no cyclo do *Procamallanus cearensis* no caracter de hospedeiros intermediarios dispensaveis, embora muito importantes pela «concentração» de parasitos, que executam, correspondendo, portanto, ao conceito de «hospedeiros portadores» de Travassos ou de «hospedeiros de espera» *(hôtes d'attente)* de Joyeux e Baer, de que constitúem um excellente exemplo.

ABSTRACT

In this paper is described Procamallanus cearensis n. sp., Camallanoidea from the gut of Astyanax bimaculatus vittatus Castelnau, *a small Characinid fresh-water fish of the sub-family Tetragonopterinae* G., *inhabitant of the ponds and small streams near Fortaleza, State of Ceará, Northeast Brazil.*

Descriptions are given of the roundworm in the various stages of its life-history.

The intermediate hosts are Diaptomus cearensis Wright *and D. azevedoi* Wright, *naturally infested at the rate of* 2 $^0/_{00}$ *and experimentally infested at the higher rate of* 4 %*; in these intermediate hosts the larvae go rapidly from the first to the second stage and no further.*

Other Characinid fresh-water fish of the sub-family Curimatinae G., *the small Curimatus elegans* Steindachner, *the fry of which were bred artificially at the time, became infested with P. cearensis by eating infested Diaptomus; in this host the nematode goes to the third and possibly to the fourth stage, when development is arrested, the fifth stage occurring only in the definitive host.*

The signification of that apparently second intermediate host is discussed, the authors coming to the conclusion that the fry of Curimatus elegans only take the part of «hospedeiros portadores» in the sense of Travassos *or the equivalents «hôtes d'attente» according to* Joyeux *and* Baer.

BIBLIOGRAPHIA

Issajew, L. — 1934 — On the method of penetration of the Guinea Worm into *Cyclops. Med. Parasitol.*, Moscow, **3**, 212-230, *in* «Trop. Dis. Bull.», **32**, 653.

Joyeux, Ch. et Baer, J. C. — 1934 — Les hôtes d'attente dans le cycle évolutif des helminthes. *Biol. Med.*, **24**, 482-506.

Leuckart, R. — 1876 — Die Menschlichen Parasiten. C. F. Winnter'sche Verlagshandlung **2**, 109-112. Leipzig.

Pereira, C. — 1935 — Ascaridata e Spirurata parasitos de peixes do nordeste brasileiro. *Arch. Inst. Biol.*, **6**, 53-62.

Seurat, L. G. — 1920 — Histoire naturelle des Nématodes de la Berbérie. Première partie. Morphologie, développement, éthologie et affinités

des Nêmatodes. Travaux du lab. de Zoologie Générale. Fac. des Sc. Université d'Alger, *in* JOYEUX et BAER — 1934.

TOERNQUIST, N. — 1931 — Die Nematodenfamilien Cucullanidae und Camallanidae. *Goeteborgs Kungl. Vetenskaps — och Vitterhets-Samhoelles Handlingar*, Femte Foeljden, Ser. B. **2**, n.º 3, 1-441 — 17 estampas.

TRAVASSOS, L. — 1923 — Evolução dos Nematodeos. *Arch. Paranaenses de Medicina*, **4**, 3-13.

TRAVASSOS, L., ARTIGAS, P. et PEREIRA, C. — 1928 — Fauna helminthologica dos peixes de agua doce do Brasil. *Arch. Inst. Biol.*, **1**, 5-68.

VAZ, Z. et PEREIRA, C. — 1934 — Contribuição ao conhecimento dos nematoides de peixes fluviaes do Brasil. *Arch. Inst. Biol.* **5**, 87-103.

WRIGHT, S. — 1936 — Limnologia das aguas de S. Paulo. *Arch. Inst. Biol.*, **7**, 65-73.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 30

Fig. A — *Procamallanus cearensis:* larva do 3.º estadio (a mesma da fig. 6), photo da extremidade anterior. Toto-montagem em balsamo.

Fig. B — *P. cearensis:* larva do 3.º estadio (a mesma da fig. 6), photo da extremidade posterior. Toto-montagem em balsamo.

Estampa 31

Fig. C — *Procamallanus cearensis:* larva do 3.º estadio, obtida do intestino de um alevino de *Curimatus elegans* STEINDACHNER, medindo 16,2 mm. de comprimento total, photo da extremidade anterior. Toto-montagem em balsamo.

Fig. D — *P. cearensis:* macho obtido do intestino de um alevino de *C. elegans*, medindo 23,7 mm. de comprimento total, photo da extremidade anterior. Toto-montagem em balsamo.

Estampa 32

Photo de um exemplar de *Diaptomus cearensis* WRIGHT, 1936, parasitado por uma larva do 2.º estadio de *Procamallanus cearensis*. Toto-montagem em balsamo.

Estampa 33

O mesmo exemplar da estampa 32, mostrando as estrias da capsula buccal da larva de 2.º estadio de *Procamallanus cearensis* através da parede do corpo de *Diaptomus cearensis*. Toto-montagem em balsamo.

———o———

A

B

O ISOLAMENTO DE ANAEROBIOS EM PLACAS. MODIFICAÇÕES DO PROCESSO FORTNER

POR

C. Rodrigues

Trabalho do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 1 figura no texto

A maior difficuldade dos trabalhos com anaerobios, sempre consistiu na obtenção rapida e segura de culturas puras.

Dada a pouca segurança dos outros methodos de pesquiza, todos os esforços convergiram sempre para a obtenção de colonias isoladas, em meios solidos, primeiro englobadas inteiramente na massa do meio, depois em colonias superficiaes.

A obtenção de colonias isoladas na massa de meios solidos é evidentemente de technica menos difficil; as difficuldades surgem porém não só no momento da colheita dessa colonia, pela maior probabilidade de uma contaminação, como tambem, e ahi de forma insuperavel, quando germens da propria cultura, colonias pouco visiveis ou de crescimento diffuso se confundem com os da colonia a ser retirada.

Pois é necessario levar em consideração a tendencia muito accentuada entre os anaerobios, de formar colonias symbioticas mixtas, que, dada a pequena variação morphologica apresentada por colonias englobadas na massa, exigem numerosos reisolamentos successivos, para maior garantia de pureza. E, ainda, essa mesma semelhança morphologica entre as colonias de diversos germens na massa de meios de cultura, difficulta sobremaneira o trabalho, quando com material muito contaminado, perturbando a escolha das colonias a serem repicadas.

A necessidade de contornar essa difficuldade pelo uso de uma grande serie de semeaduras, com diluições cada vez maiores do material original até obtenção de tubos com poucas colonias bem separadas, diminue em grande parte a simplicidade do methodo, além de exigir que no material a examinar a maioria dos germens seja o typo procurado.

Por todas essas razões a attenção dos pesquizadores concentrou-se em methodos que permittissem obter colonias na superficie do meio de cultura, apezar das difficuldades naturaes que apresentam. Como resultado dessa concentração de esforços appareceram, especialmente após 1917, varios methodos baseados na formação de um ambiente parcial ou totalmente isento de oxigenio, no qual fosse possivel aos

anaerobios desenvolverem-se sob a forma de colonias na superficie dos meios solidos. Ao lado de outros methodos, empregados mais esporadicamente, ganharam universalidade os preconizados por Mc Intosh-Fildes-Brown, por Zeissler e por Fortner.

Apezar disso, dada a extraordinaria sensibilidade ao oxigenio livre, que apresentam esses germens, e especialmente alguns, da maior importancia na pathologia humana e veterinaria, a cultura de anaerobios em superficie continua a ser difficultosa e demorada. Ainda nenhum dos methodos actuaes satisfaz os requisitos essenciaes para o seu uso na pratica rotineira, isto é, simplicidade e segurança no manejo, regularidade nos resultados, baixo preço de custo.

No serviço de Anaerobios do Instituto Biologico, em cuja rotina predominam os exames, para diagnostico, de material em geral muito contaminado, em regra suspeito de infecção pelo *Clostridium chauvoei,* os tres methodos acima referidos foram por nós experimentados, sem que nenhum delles pudesse ser introduzido, de maneira definitiva, na pratica habitual.

* * *

O processo de Zeissler, empregado isoladamente, exige, em primeiro logar, um dispendioso apparelho de vacuo, do qual aliás dispomos. Em segundo logar, uma jarra que precisa ser leve, absolutamente estanque e sufficientemente forte para resistir a um vacuo absoluto.

Jarras de vidro commum, do typo «dissecadores» e de diversas marcas não se nos mostraram sufficientemente resistentes para admittir um vacuo quasi absoluto, necessario ao exito deste processo. Jarras de vidro de um typo especial americano mostraram-se capazes de resistir a tal pressão, mas, talvez devido ao diametro exagerado da bocca, e provavelmente em consequencia de uma deformação da tampa pelo grande esforço exigido, não mantinham pelo tempo necessario o vacuo estabelecido.

Foi sempre usada, para vedar as partes em mero contacto, uma camada intermediaria de vaselina solida.

O uso de jarras metalicas, impossibilitando completamente a observação da evolução das culturas e a fiscalização do bom desenvolvimento do processo, não nos pareceu pratico. De qualquer forma, um apparelho especial, dispondo de vacuometro, não seria barato.

O processo Zeissler pode ser empregado usando-se material menos resistente, associando-se a um vacuo parcial uma absorpção chimica complementar do oxigenio. Este processo mixto, que além de se tornar complicado introduziria os inconvenientes da absorpção chimica, não foi por nós considerado.

O systema Mc Intosh-Fildes-Brown, foi aqui empregado durante muito tempo, primeiro pelo Dr. A. M. PENHA, depois por nós, com resultados satisfactorios. Seus principaes inconvenientes, além da apparelhagem um tanto complicada de geradores e lavadores de Hydrogenio, são os seguintes: — em primeiro logar a lentidão com que se completa uma exhaustão conveniente do oxigenio, mesmo que por vacuo parcial se retire uma parte delle; — em segundo logar, a rapida inutilização do catalysador e de sua rede metallica protectora, em consequencia dessa mesma acção demorada, quando esses pontos susceptiveis de oxidação ficam submettidos a um ambiente humido e aquecido, ainda em presença de oxigenio.

A engenhosa solução proposta por Fortner, actualizando conhecimentos já de longa data adquiridos, attrahiu desde logo a attenção dos technicos. Numerosas modificações têm apparecido, tendentes a simplificar e melhorar o processo. Ellas dizem respeito, ou á forma de obter numa mesma placa culturas bem isoladas do aerobio e do anaerobio, ou a uma vedação mais perfeita.

Os inconvenientes da placa de FORTNER original e de algumas modificações de sua technica, são: o lento crescimento da cultura aerobia, destinada a absorver o oxigenio ambiente da placa; a difficuldade de obter culturas do aerobio e anaerobio perfeitamente isoladas, dada a necessidade de se usar um aerobio de crescimento intenso, o que quasi sempre quer dizer, invasor. Dentro de um ambiente forçosamente saturado de humidade, com condensação desta nas paredes do vaso, é uma difficuldade quasi insuperavel impedir que a parte destinada ao desenvolvimento do anaerobio seja invadida pelo germen aerobio; este inconveniente nem sequer é removido pelo uso de diversas das modificações propostas, no que diz respeito ao modo de separar as duas partes do meio, pelo uso de placas especiaes com divisão central, pelo de substancias oligodynamicas, pelo uso de duas placas voltadas uma contra a outra, ou outros artificios de technica.

Outro factor importante de insuccessos no uso da placa de FORTNER é a tendencia á abertura das placas pela pressão de gazes produzidos no seu interior ou, ainda, pela simples dilatação do ar nellas encerrado, quando submettidas á temperatura da estufa.

Os diversos inconvenientes acima enumerados levaram-nos a modificar o systema FORTNER, adaptando-o á anaerobiose em jarras.

Tornava-se assim possivel: 1.º) — Usar um vacuo parcial, apressando o estabelecimento de condições favoraveis de crescimento. 2.º) — Impedir por esse mesmo vacuo uma pressão elevada interna, com tendencia a abrir o recipiente. 3.º) — Permittir o uso de culturas aerobias em meios liquidos, onde, como é sabido, o desenvolvi-

mento se processa com muito maior rapidez que nos meios solidos. 4.º) — Obter muito maior garantia contra a contaminação das placas anaerobias pelo material aerobio.

A principio empregamos para a absorpção de oxigenio a amostra de *Serratia marcescens (B. prodigiosus)* recebida directamente de FORTNER, a quem apresentamos aqui nossos agradecimentos.

Mais tarde, em vista da possibilidade de usar amostras de grande actividade, mesmo quando invasoras, passamos a empregar uma amostra de *Proteus* sp., — *Proteus* Coelho *0001* — de vegetação

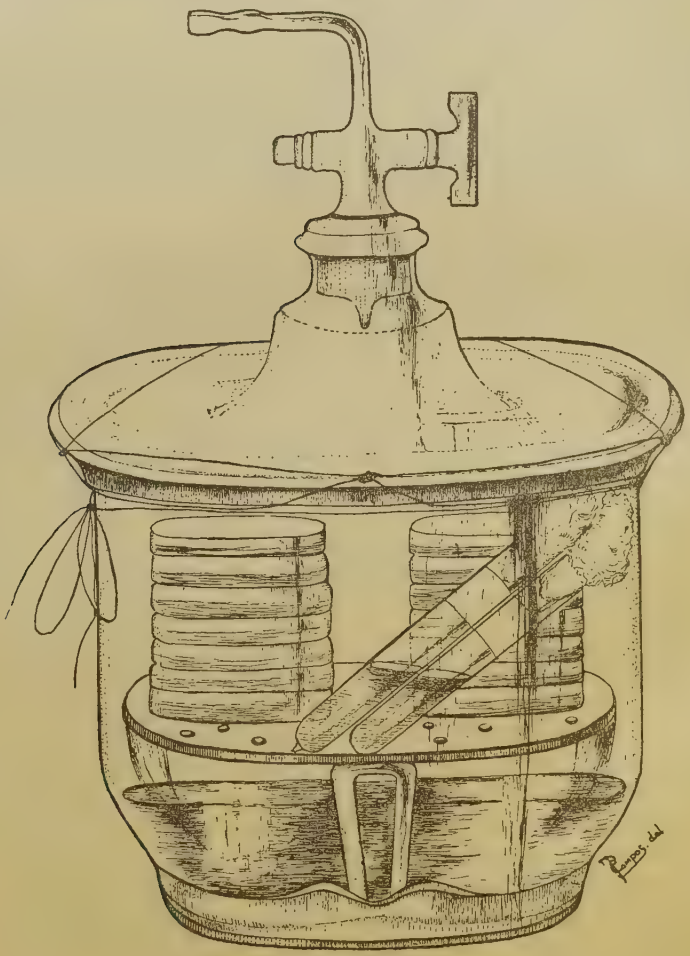


Fig. 1 — Desenho da jarra

extraordinariamente rapida. Sendo este germen facultativo, e exhibindo quasi a mesma intensidade e velocidade de crescimento, tanto em condições aerobias como anaerobias, não teria assim sua vitalidade attingida quando o oxigenio contido no ambiente limitado da placa se tornasse rarefeito.

Para o processo FORTNER em jarra, temos usado com egual successo jarras (dissecadores) de typos PYREX e SCHEIBLER. Para jarras de 5 litros de capacidade, empregamos um litro de caldo para a cultura aerobia. O caldo é inoculado com 5 a 10 cc de cultura já bem desenvolvida do germen reductor, no momento em que são collocadas na jarra as placas semeadas com os anaerobios, (placas de agar-sangue de carneiro, conforme FORTNER). Na pratica verificamos ser desnecessario preparar com antecedencia este material de inoculo aerobio, bastando transferir 5 a 10 cc de cultura de uma jarra anteriormente utilizada para o caldo esteril da que vae ser utilizada no momento. Ou ainda, no caso de se dispor de uma unica jarra, o simples residuo da vegetação anterior; neste caso, a jarra é esvasiada, mas não lavada, e sobre ella se derrama o caldo fresco.

Deve-se notar que esta cultura aerobia em breve fica longe de ser pura. Ha apenas uma grande preponderancia do *Proteus*. De qualquer maneira, não nos parece absolutamente necessario empregar esta amostra; é muito provavel que numerosos outros germens facultativos preencham tambem a mesma funcção.

Esse systema, que desde alguns annos vem sendo por nós empregado, a principio comparativamente com o de MC INTOSH-FILDES-BROWN e actualmente em exclusividade, sempre deu resultados satisfactorios do ponto de vista de permittir crescimento franco das mais exigentes especies anaerobias. Frequentemente estabelecemos, para maior garantia de exito tanto na absorpção de oxigenio como na vedação das partes em mero contacto, um vacuo parcial (40 a 60 cms. no vacuometro). Entretanto esse vacuo parcial não é indispensavel, embora muito util e facil de effectuar, por meio de qualquer trompa.

A absorpção de oxigenio pelas bacterias aerobias, neste processo, é controlada pelo descoramento do azul de methyleno dissolvido em caldo de carne. Em um quadro vão enfeixados os resultados comparativos, com e sem vacuo, a 37° e a 23°.

Quadro do descoramento do azul de methyleno em jarra de symbiose

	Temperatura — 23°			Temperatura — 37°		
	Vacuo 60	Vacuo 40	S/ vacuo	Vacuo 60	Vacuo 40	S/ vacuo
Gaze. .	24 h.	84 h.	110 h.	15 h.	20 h.	86 h.
Tubo. .	36 h.	92 h.	120 h.	24 h.	36 h.	105 h.

Na verdade seria pouco explicavel o exhuberante crescimento de germens como *Clostridium chauvoei, Cl. novyi* e outros, formando já, em 3 dias, colonias completamente desenvolvidas, apezar da relativa lentidão com que se estabelece a anaerobiose. Não nos propomos aqui analysar com o merecido detalhe esta questão, que exige naturalmente um estudo minucioso dos diversos productos gazosos do metabolismo dos aerobios e sua acção sobre os anaerobios. Neste sentido, é conhecida a influencia activadora do CO_2, como tambem, segundo BACHMANN & OGAIT, a influencia perniciosa de outros productos metabolicos gazosos.

Um inconveniente serio do systema que acabamos de descrever, como aliás de todos os systemas de anaerobiose em jarra, é a difficuldade de fechamento hermetico. Os gazes formados pelo desenvolvimento da cultura aerobia tambem aqui tendem a forçar a abertura da jarra, sendo necessario, quando esta é mantida em estufa a 37° C, temperatura em que se funde a vaselina, prender fortemente a tampa ao corpo.

E' neste caso que grande auxilio pode prestar a pratica de um vacuo parcial. Este compensa a formação posterior de gaz pelas culturas, evitando que a pressão interna da jarra se torne superior á externa, além de outras vantagens já descriptas.

SUMMARIO

Descreve-se uma modificação no processo FORTNER, para obtenção de ambiente isento de oxigenio, para cultura de anaerobios em superficie.

Esta modificação evita os seguintes inconvenientes:

a) abertura do recipiente por pressão interna de gazes;

b) lentidão no estabelecimento da condição anaerobia;

c) probabilidade de contaminação da cultura anaerobia pelos germens aerobios absorventes de oxigenio.

Consiste a modificação no emprego de jarra de vidro (dissecador) contendo cultura liquida do germen aerobio e placas semeadas com anaerobio.

Esta jarra é bem fechada e munida de torneira, por onde se pode por sucção retirar uma parte do ar nella contido, o que contribue grandemente para evitar os inconvenientes descriptos como a) e b).

Os anaerobios mais exigentes puderam ser assim facil e exhuberantemente cultivados.

SUMMARY

There is described a modification of FORTNER'S *process for obtaining an oxygen free ambient, necessary to the cultivation of anaerobes on the surface of solid culture media.*

This modification avoids the following inconveniences:

a) *opening of the recipient because of internal gaz pressure.*

b) *slowness of establishing an anaerobic condition.*

c) *possibility of contamination of the anaerobic culture by the aerobic oxygen absorbing organisms.*

The modification consists in employing a glass jar (*dessicator*) *containing a liquid culture of the aerobic germs and plates inseminated with the anaerobic germs.*

This jar is tightly closed and provided with a stop-cock, by means of which a part of the inclosed air can be removed by suction. This contributes largely to avoid the inconveniences described under the items «a)» and «b)».

The most delicate anaerobes could thus be easily cultivated in abundance.

BIBLIOGRAPHIA

BACHMANN, W. — 1934 — Cent. Bakter., I, O, **132**, 366.
BACHMANN, W. & OGAIT — 1934 — Cent. Bakter., I, O, **134**, 281.
BROWN, H. — 1921 — Jl. Exper. Med., **33**, 677.
BROWN, H. — 1922 — Jl. Exper. Med., **35**, 467.
DOLD, H. & GILDEMEISTER, E. — 1928 — Cent. Bakter., I, O, **109**, 344.
FORTNER, J. — 1928 — Cent. Bakter., I, O, **108**, 155.
FORTNER, J. — 1929 — Cent. Bakter., I, O, **110**, 233.
HAUPTMANN, W. — 1931 — Cent. Bakter., I, O, **121**, 385.
HERMANN, L. G. — 1932 — Jl. Bakter., **23**, 331.
HODER, F. — 1930 — Cent. Bakter., I, O, **117**, 542.
KAPLAN, M. — 1935 — Cent. Bakter., I, Ref., **117**, 411.
KLEINSORGEN & JUSATZ, H. J. — 1932 —Cent. Bakter., I, O, **126**, 157.
KLOCKER, L. — 1932 — Cent. Bakter., I, O, **125**, 525.
KOCH, F. E. — 1934 — Cent. Bakter., I, O, **132**, 358.
MC INTOSH, P. & FILDES, J. — 1916 — Lancet, **1**, 768.
MC INTOSH, P. & FILDES, J. — 1921 — Brit. Jl. Exper. Pathol., **11**, 153.
MIESSNER & SCHOOP, G. — 1934 — Deut. Tierärztl. Wochens. pg. 321.
RIEMSDIJK, M. VAN — 1922 — Cent. Bakter., I, O, **88**, 229.
SNIESKO, S. — 1930 — Cent. Bakter., II, O, **82**, 110.
TEMPÉ, G. — 1931 — Compt. Rend. Soc. Biol., **107**, 1021.
WAKAMATSU, Y. — 1934 — Deut. Tierärztl. Wochens., pg. 321.
ZEISSLER, J. — 1928 — *in* Kolle, Kraus & Uhlenhut, vol. 10.

ESTUDOS SOBRE O "CLOSTRIDIUM CHAUVOEI". VARIAÇÕES NA MORPHOLOGIA DAS COLONIAS.

POR

C. Rodrigues

Trabalho do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 1 figura no texto e estampas 34-40

As colonias formadas pelo *Clostridium chauvoei* em placas de agar sangue glycosado, em condições favoraveis de anaerobiose, são descriptas por ZEISSLER como formas arredondadas, em botão de madreperola, ou denteadas como folha de videira, chatas e enterradas na parte central de uma entumescencia em colina do meio de cultura. Brilhantes, azul violaceo delicado e dando pequena hemolyse circular.

Este aspecto é aqui esquematizado na figura 1, desenho calcado na figura publicada por ZEISSLER em sua monographia sobre o assumpto, no vol. X da edição de 1928 do KOLLE, KRAUS & UHLENHUT. A forma representa o typo IV da classificação de ZEISSLER, e é por elle dada como caracteristica da especie.

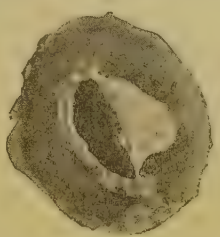


Fig. 1 — Colonia de *Cl. chauvoei*. Segundo ZEISSLER *in* KOLLE-KRAUS-UHLENHUT, vol. X, 1928.

Admittindo-se que o emprego rigoroso da technica de ZEISSLER no estudo das amostras de *Cl. chauvoei* permitta sempre a observação de colonias de morphologia typica, é evidente que esta technica representa um recurso muito efficaz nos exames diagnosticos. Pois a necessidade de uma escolha para a repicagem de estudo entre as diversas colonias crescidas em uma placa, semeada para diagnose de carbunculo symptomatico, é evidente.

O facto, porém, de ser necessario o uso de uma technica estricta e sempre rigorosamente identica, tornaria muitas vezes praticamente impossivel obter-se esse typo regular. Demais, a experiencia

dos diversos pesquizadores cedo veio demonstrar que, si de facto esse aspecto representa o modo de crescimento habitual da especie, quando se trata de amostras desde longo tempo cultivadas e mantidas em condições bem definidas de cultura em placa, deixa de corresponder á realidade quando se trata de culturas diagnosticas, de isolamento recente, ou quando de qualquer forma se foge da base technica de cultivo estabelecida por esse pesquizador.

Já FORTNER, em seus trabalhos introductorios do methodo hoje universalmente conhecido como da «placa de Fortner», declara e exemplifica que, embora o aspecto descripto por ZEISSLER seja o encontrado na maioria das amostras, estas podem dar origem a prolongamentos em raizes, ou mesmo véo de crescimento expansivo. (Figs. 15, 16 e 17 de sua publicação no vol. 110 do Centralb. Bakter.).

WOLTERS & DEHMEL tambem denunciam as irregularidades possiveis de se encontrarem nas colonias, chamando em especial a attenção para o processo de dessecamento do meio, antes de semeado, do qual, segundo elles, depende o apparecimento ou não apparecimento de halo diffuso nas colonias. Especial difficuldade encontraram esses autores na observação do entumescimento do meio, descripto por ZEISSLER, mesmo em culturas recebidas directamente deste pesquizador; usavam placas de agar sangue de carneiro. O que se observou constantemente foi uma elevação do bordo da colonia, cujo centro ficava afundado. O crescimento dito em «kokarde», de bordos com declive rapido, era raro. A superficie das colonias apresentava sempre, em 3-4 dias, um aspecto mate finamente granulado.

Outros autores têm tambem encontrado variabilidade nas colonias formadas pelas amostras chauvoei, procurando alguns explicar esse facto pelas differenças de humidade do meio e de edade das culturas usadas para semeadura da placa, (Viljoen & Scheuber), abstendo-se outros de qualquer explicação (Rottgardt, Mc Ewen, etc.).

Nossa experiencia leva-nos a acreditar que, em condições de cultura exactamente identicas, muitas amostras apresentam forma de crescimento peculiar, susceptivel muitas vezes de ser encaixada em um padrão bastante maleavel, mas outras vezes fugindo completamente delle. Ao lado dessas amostras, parece-nos haver ainda outras que se caracterizam pela irregularidade das colonias formadas, apresentando-se na mesma placa os typos mais variados e differentes.

Com effeito, é muito provavel que tambem innumeros factores extrinsecos tenham influencia na formação da colonia, não sendo possivel fixal-os previamente nos exames de material colhido para diagnostico. Ha ainda a considerar a frequente variabilidade entre as amostras de isolamento recente, e tendencias especiaes de cada

amostra, individualmente. Trabalhando-se com jarras de grande capacidade, contendo de 10 a 20 placas de cultura, com amostras differentes, verifica-se que de facto o factor principal de variação entre as colonias de *Clostridium chauvoei* deve residir nessas tendencias individuaes de cada amostra.

E se numerosas amostras de *Cl. chauvoei* tendem a apresentar colonias de um typo uniforme, com caracteristicas proprias, outras, como já foi exposto, e principalmente amostras recentemente isoladas de casos de doença natural, ou mesmo apenas reactivadas em animaes de laboratorio, formam um verdadeiro mosaico de colonias as mais variadas, cada uma dellas capaz de reproduzir todos os outros aspectos, quando semeada.

Ha por isso outro aspecto do problema aqui focalizado, que nos parece bastante interessante para ser examinado, sobretudo quando a technica e os methodos de Zeissler não podem ser applicados: é o conhecimento dos typos de variação susceptiveis de apparecer nas colonias formadas pelo *Cl. chauvoei,* permittindo reconhecer o germen procurado, mesmo quando mascarado sob differentes formas aberrantes.

E parece-nos portanto que o problema do isolamento do *Clostridium chauvoei* por cultura em placa, para fins diagnosticos, deve ser desviado da determinação de um unico aspecto que deva caracterizar tal germen, para a dos aspectos que se possam encontrar, embora nem sempre typicos.

E' com o intuito de contribuir para o conhecimento dessas diversas formas de colonia em culturas verificadas puras, desse germen, que procuramos tornar conhecida nossa experiencia a tal respeito. Trabalhamos com 34 amostras, sendo 20 recebidas de diversas collecções e pesquizadores europeus e americanos, e 14 isoladas por nós.

Todas as nossas verificações foram feitas em culturas de 3 dias sobre agar sangue, sem glycose, em jarras de symbiose que recentemente propuzemos como modificação do processo conhecido como da «placa de Fortner». Esta modificação consiste no emprego de jarras fechadas contendo culturas dos anaerobios em placas de agar sangue e culturas em caldo de carne dos germens encarregados de absorver o oxigenio ambiente (Veja Rodrigues, nesta Revista, artigo 18). Nessa jarra de symbiose, a 23° C, as colonias formadas em 3 dias pelo *Clostridium chauvoei,* na maioria das amostras bem adaptadas aos meios artificiaes, se nos mostraram perfeitamente circulares e bombeadas, de superficie lisa e sem differenciação central, rodeadas de halo de franca hemolyse, medindo duas a tres vezes o diametro da colonia.

Entre estas, distinguem-se por transparencia dois typos, um perfeitamente hyalino e outro mais opalescente; as primeiras são bem mais elevadas e globosas que as segundas.

Estes aspectos são representados na estampa 34.

Estas mesmas amostras, quando cultivadas a 37° C, formam colonias ligeiramente differentes, no sentido de se apicularem e apresentarem bordos finamente repicados, ou franjados, ou lobados. (Estampa 36, Fig. *A).*

O aspecto classico, descripto por ZEISSLER, foi por nós verificado apenas uma unica vez, aliás de uma maneira invertida, como se pode observar na estampa 36, fig. *B.* Tratava-se de colonias que occasionavam no meio de cultura uma depressão, no centro da qual se localizavam. Esse caracter foi observado apenas em algumas colonias de uma placa semeada com uma de nossas amostras; essas colonias estavam situadas na periferia da placa, o que parece indicar que o aspecto observado tenha sido provocado por um dessecamento excessivo do meio, pois as colonias mais centraes não o apresentavam.

Algumas amostras, entretanto, apresentam colonias de caracteres bem distinctos, reproduzidos na estampa 35; este aspecto, presente a 23° C e tambem a 37° C, pode ser descripto como colonias chatas, razas, esparramadas, de superficie com circulos concentricos e bordos mais elevados, irregularmente franjados; as colonias são delicadas, cinzentas, translucidas, francamente hemolyticas. Ao lado destas, encontram-se raras colonias do typo normal. Evidentemente, este aspecto particular não pode ser attribuido a nenhum factor extrinseco.

Todos os aspectos acima citados referem-se a amostras de longa conservação, bem adaptadas aos meios artificiaes. Quanto a amostras de isolamento recente, a formação de véo é muito frequente, mesmo usando-se placas dessecadas. As amostras recentemente isoladas, e algumas de longa conservação, apresentavam-se uma vez ou outra com esse crescimento, havendo entre ellas algumas com maior e outras com menor tendencia para isso. Dentro da mesma jarra, e portanto em egualdade de condições, podia-se verificar que algumas amostras cresciam em colonias bem isoladas, ao passo que outras cresciam em film homogeneo, sem differenciação em colonias.

Colonias do typo que poderiamos chamar estabilizado, isto é, as mais frequentes entre amostras de longa conservação, encontram-se quasi sempre, embora de mistura com os outros diversos typos. Na Estampa 37 são representados esse aspecto e algumas de suas variantes, com predominancia os typos chato e globoso.

O typo apresentado por FORTNER em sua figura 13 (Centralb. Bakter. vol. 110) é tambem muito frequente. Reunimos na estampa

38 uma serie de representantes deste typo, ou de suas variantes. Intermediario entre esse e o dado na figura 15 do mesmo trabalho de FORTNER, é o aspecto por nós observado na amostra Mq 1, botão central com sulco e borraina, sempre lisos, com tendencia a espalhamento. Este aspecto se vê na estampa 39, grupo *A*.

Ao lado desses dois typos, que são os mais frequentes nas culturas de isolamento recente, algumas amostras apresentam differentes formas de crescimento.

Assim, observam-se colonias em casca de laranja, chatas como em Mq 9 e Mq 16, ou apiculadas como em Mq 16. Outras se apresentam quasi estrelladas, verrucosas, ou rhizoides. Todos estes typos de colonia têm a superficie rugosa. São representados na estampa 39, grupo *B*.

Entre as colonias de superficie lisa, notam-se algumas montanhosas, regulares (Mq 28), ou irregulares (Mq 27, Mq 16); a amostra Mq 27 fornece ás vezes colonias muito semelhantes ás formadas por amostras rugosas de *Clostridium welchii*. E tambem se observam colonias em plató chato e elevado, liso ou rugoso. Todos esses typos estão representados na estampa 40, grupo *A*.

O aspecto dado por WOLTERS & DEHMEL como muito constante, constituido por colonias crateriformes, e tambem descripto por FORTNER, foi por nós encontrado, embora raramente (estampa 39, fig. *C*).

Outra forma, bastante curiosa, semelhante á fornecida pelo *Bac. parabotulinus* segundo é annotado por FORTNER, foi por nós verificada em Mq 11. Está representada na estampa 40, grupo *B*.

* * *

Com o envelhecimento, cada uma dessas amostras de isolamento recente tende a formar colonias de typos mais homogeneos entre si, embora o aspecto de taes colonias varie de amostra para amostra. Algumas que inicialmente formavam typos de colonia irregulares vão pouco a pouco aproximando-se dos typos estabilizados; mas não todas. E outras ha que logo no primeiro isolamento se apresentam assim.

Embora todas as culturas originaes, que geraram as variadas formas de colonia aqui registradas, fossem culturas tidas como puras, isoladas em placas e caracterizadas logo após o isolamento, quando se tratava de culturas diagnosticas, ou reverificadas quando recebidas de outrem, muitas das colonias aqui descriptas não tiveram caracterização ulterior, sendo abandonadas as culturas que dellas derivaram depois de verificado o aspecto morphologico e a condição anaerobia.

Entretanto, para illustrar ainda com maior base a grande variabilidade das colonias que verificamos poderem ser produzidas por amostras de *Clostridium chauvoei,* reproduzimos em dois quadros os protocolos de estudo diagnostico de material proveniente de bovinos suspeitos de infecção por este germen, e que foram examinados recentemente.

Vê-se por estes quadros que as colonias obtidas apresentavam morphologia muito variavel; apesar disso, 7 dentre ellas, que foram submettidas a estudo ulterior, puderam ser identificadas ao *Clostridium chauvoei;* o material 0095, destinado exclusivamente a fins diagnosticos, teve muitas das colonias abandonadas, não se chegando á caracterização final de todas ellas. Entretanto, foram escolhidos para caracterização dois typos extremos.

Demais, ambos estes quadros são apresentados, não com o intuito de demonstrar que todas as colonias verificadas pertenciam á especie *Clostridium chauvoei,* mas antes para tornar evidente que essa especie é apta a formar colonias cujos aspectos morphologicos não coincidem.

SUMMARIO

Foi verificada grande variabilidade na forma das colonias produzidas por amostras de *Clostridium chauvoei,* recentemente isoladas ou recuperadas depois de passagem em animal, e tambem em amostras de longa conservação, perfeitamente adaptadas aos meios artificiaes de cultura, que muitas vezes estão longe de apresentar um typo de colonia sempre uniforme.

Essa variabilidade comprehende differenças morphologicas entre colonias de differentes amostras, mas tambem entre colonias da mesma amostra, em occasiões diversas ou na mesma occasião e na mesma placa de cultura.

Este estudo é baseado no exame de 20 amostras bem adaptadas e de longa conservação, e de 14 recentemente isoladas, de caso natural ou de animaes inoculados.

E' evidenciada a necessidade do conhecimento dessas variações morphologicas das colonias de *Clostridium chauvoei* para o bom exito dos exames diagnosticos baseados em cultura em placa. Para isso são descriptos e representados por photographias os typos de colonia mais frequentes entre as que se afastam do aspecto caracteristico descripto por ZEISSLER. São apresentados tambem dois quadros demonstrativos.

As culturas anaerobias de superficie foram sempre effectuadas em agar sangue sem glycose, por meio de jarra de symbiose (processo FORTNER modificado).

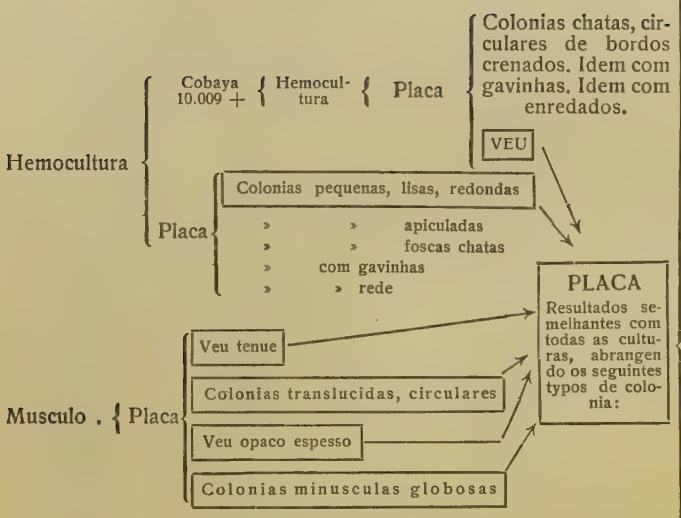
MATERIAL 0095

Cultura recebida do Dr. A. M. Penha. Hemocultura da cobaya 10,034 inoculada com cultura em Tarozzi da medulla de canella de bezerro supposto morto de Manqueira. O aspecto da cobaya era o dado por infecção com *Cl. Chauvoei*. Germens isoladas na superficie do figado. Esporulação presente logo após a morte. A cultura recebida não cresce em aerobiose.

				Purificação	Classificação	N.º
Original . Placa	Colonias claras, chatas. Bordos denteados e superficie plana. Hemolyticas.	Placa	Colonias grandes, mais ou menos elevadas, globosas de bordos lisos ou finamente crenados. (não cresceu)	—	—	—
			Colonias grandes, foscas, de bordos denteados, superficie lisa e elevada (cresce em anaerobiose). Quadro typico na cobaya.	Colonias grandes, apiculadas de bordos lisos e declive suave.	*Chauvoei*	109
				Colonias identicas, mas com gavinhas, rêde ou film.	*Abandonada*	—
				Colonias de centro convexo, sulco e borraina. Peripheria lisa.	*Abandonada*	—
				Colonias identicas com rugosidades superficiaes.	*Abandonada*	—
			Colonias pequenas, chatas, regulares (cresce em anaerobiose. Quadro typico na cobaya.	Colonias grandes, apiculadas, de bordos lisos e declive mais ou menos suave.	*Abandonada*	—
				Colonias identicas mas emittindo gavinhas lisas ou complicadas em rêde ou film.	*Abandonada*	—
				Colonias do typo original.	*Chauvoei*	110
				Colonias de centro convexo, sulco e borraina peripherica lisa.	*Abandonada*	—
				Colonias identicas com rugosidades superficiaes lembrando colonias filhas.	*Abandonada*	—
	Colonias circulares, apiculadas, regulares, não expandindo. Não hemolyticas.			—	*Abandonada*	—

MATERIA

Exame de material da cobaya 9995, morta em consequencia de inoculação com cultur
para exame diagnostic



A) Colonias razas, regulare
mente granular. Bordo

B) Colonias elevadas em escudo, tendendo a apicular — *Amostra escudo* (9.995 MTC com expansão escudo)

C) Colonias apiculadas, elevadas, grandes, lisas regulares de bordos circulares. — *Amostra azulada* (9995 minuscula globosa, azulada, cupuliforme)

D) Colonias apiculadas de bo
original).

E) Colonias em botão de bo
original).

F) Colonias em botão com gavinhas. — *Amostra gavinha*

G) Colonias em botão com gavinhas, expandindo em film. — *Amostra Rêde* (9.995 MTC com expansões Rêde).

H) Colonias em botão co
irregular, ou elevada e

0094

em Tarozzi de uma emulsão aquecida a 80º-30' do material 0094 (Canella de bezerro *Cl. chauvoei)*

	PLACAS:				
	1.ª Purificação	2.ª Purificação	3.ª Purificação	Classificação	Numero
de superficie fosca ou finabem regulares. (Egual ao 108).	—	—	—	—	—
Placa chloral a 0,2 % — ESCUDO Colonias de um só typo com gavinhas e nós. (Quadro typico na cobaya)	Colonias em boça. Colonias discoides. (Abandonadas. Eguaes a 105 lisa).	Colonias chatas, razas esparramadas, sem centro proeminente ou com botão central; grandes. Bordos lisos ou picados.	—	CHAUVOEI	108
Placa chloral a 0,2 % — AZULADA Colonias cupuliformes. (Quadro typico na cobaya). Colonias como *Novyi* (Não repicadas. Eguaes a *Rêde-Rêde)*	—	Colonias montanhosas com verrugas e bordos lisos.	Colonias grandes, razas, esparramadas levemente apiculadas. Bordos lisos ou finamente picados.	PERDIDA (Infecção typica na cobaya)	107
dos irregulares. (Egual a 105	—	—	—	ABANDONADA	—
dos irregulares (Egual a 105	—	—	—	ABANDONADA	—
Placa chloral a 0,2 % — GAVINHA Colonias cupuliformes (eguaes a 106 colonia). Film invasor.	—	—	—	ABANDONADA	—
Placa chloral a 0,2 % — REDE APICULADA Colonias apiculadas. (Quadro typico na cobaya)	Colonias com superficie em boças. Colonias discoides. (Abandonadas. Eguaes a 105 lisa).	Colonias elevadas com bordos lisos e verrugas.	LISA Colonias circulares de superficie lisa, sem centro differenciado.	CHAUVOEI	105
			ORIGINAL Colonias mais ou menos montanhosas de bordos recortados irregularmente.	CHAUVOEI	
Placa chloral a 0,2 % — REDE-REDE Colonias em rêde como *Novyi*. (Quadro typico na cobaya).	Colonias muito pequenas, mais ou menos montanhosas, bordos lisos ou finamente recortadas.	Colonias elevadas com bordos lisos e verrugas.	COLONIA Colonia mais ou menos montanhosa de bordos lisos ou levemente recortados.	CHAUVOEI	106
			FILM ARBORESCENTE Film mais ou menos elevado arborizado.	CHAUVOEI	
centro em cratera. Superficie borraina.	—	—	—	PERDIDA	—

SUMMARY

We have observed a large variability in the morphological appearence of the colonies formed by different strains of Clostridium chauvoei.

The strains more recently isolated, or re-isolated after experimental inoculation, were the most variable in this respect. But strains that had been isolated since a longer time, perfectly habituated to the common artificial media, presented also often, though not so frequently, this variability. It includes morphological diversity between the colonies of different strains, and also between the colonies of the same strain; it may appear at the same occasion, and on the same culture plate.

There is clearly shown the necessity of recognizing these morphological variations liable to appear in the colonies formed by Clostridium chauvoei, for the success of diagnoses based on isolation by plating.

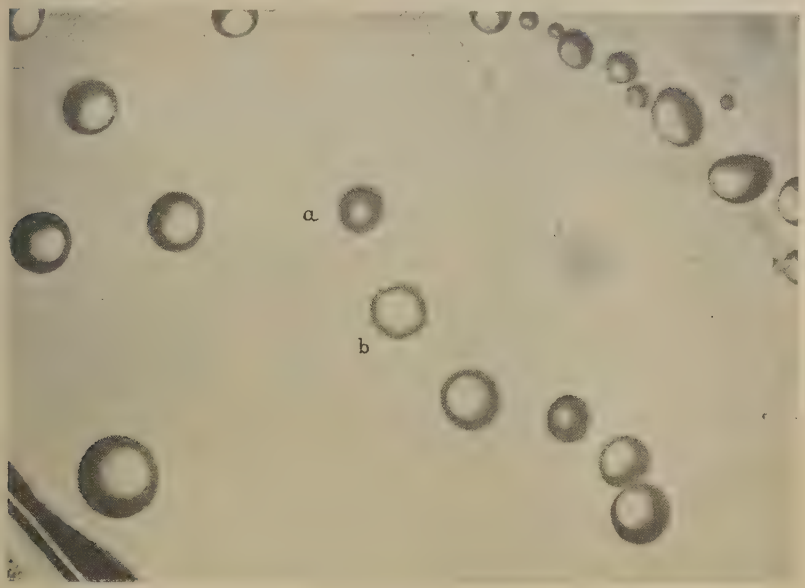
We describe and reproduce photographically several types of colonies thus formed, which we have observed. There are also included two records of diagnostic examination; these records indicate that several different types of colony correspond to the same species, that is, to Clostridium chauvoei.

This study is based on the examination of 34 pure cultures of Cl. chauvoei, 14 of which had been recently isolated.

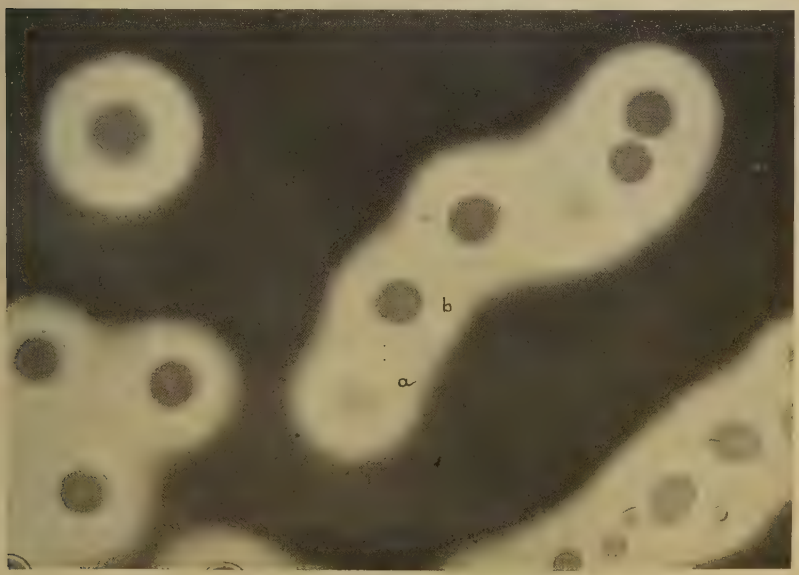
The anaerobic cultures on the surface of blood-agar plates were always obtained by means of the modification of Fortner's *plate culture method, introduced by us.*

BIBLIOGRAPHIA

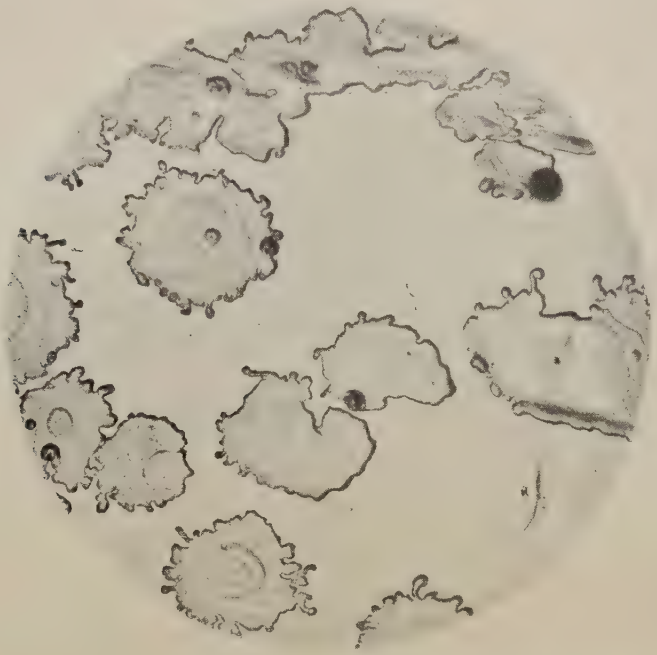
Fortner, J. — 1929 — Centr. Bakter., I, O, **110**, 247-250 e figs.
Mc Ewen, A. D. — 1926 — Jl. Comp. Path. a. Therap., **39**, 253.
Rottgardt, A. — 1932 — Bol. del Minist. Agric. Nat. Argentina, **31**, 101.
Rodrigues, C. — 1936 — Arch. Inst. Biol. S. Paulo, **7**, 227.
Viljoen, P. R. & Scheuber, S. P. — 1926 — 11th & 12th Repts. of the Dir. Veter. Educ. a. Res.; Dept. Agric. South Africa. pg. 499.
Wolters, K. L. & Dehmel, H. — 1928 — Centr. Bakter., I, O, **108**, 264.
Zeissler J. — 1928 — *in* Kolle, Kraus & Uhlenhut, **10**, 112 e figs.



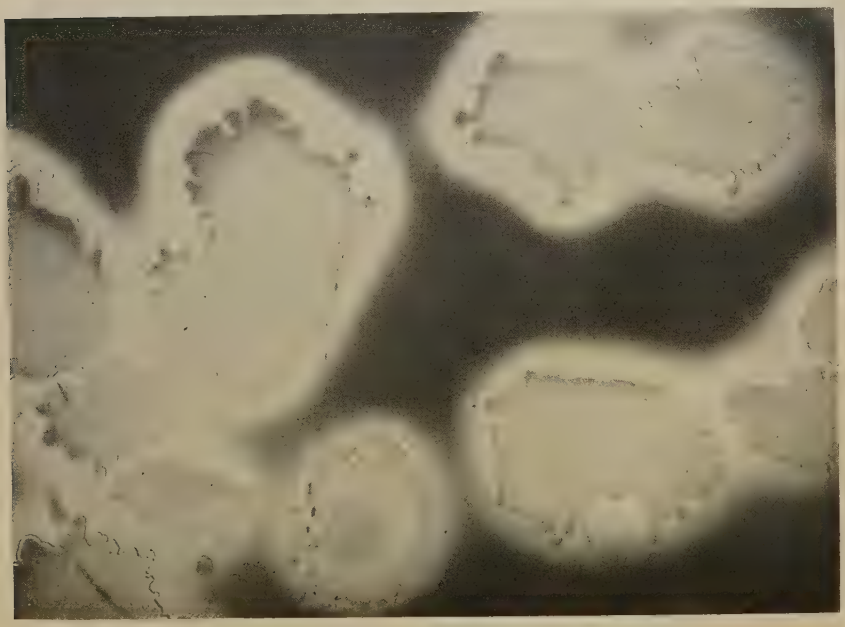
A — Colonias de *Cl. Chauvoei* vistas por incidencia. Cultivadas a 23°C
a) — hyalina; *b)* — opalescente.



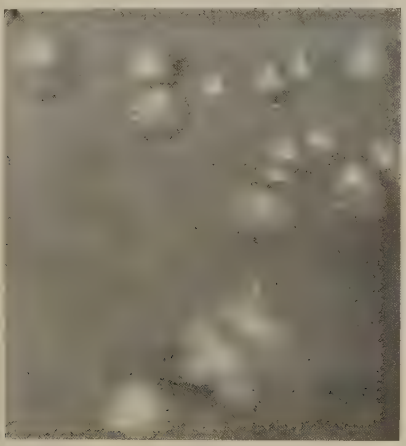
B — Colonias de *Cl. Chauvoei* vistas por transparencia. Cultivada a 23°C
a) — hyalina; *b)* — opalescente.



A — Colonia de *Cl. Chauvoei.* Incidencia. Typo esparramado



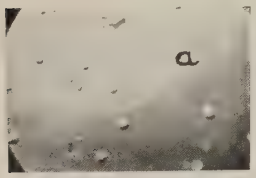
B — Colonia de *Cl. Chauvoei.* Transparencia. Typo esparramado



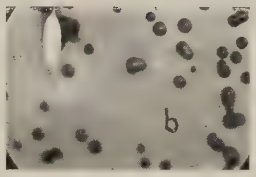
A — Colonia de *Cl. Chauvoei.* Incidencia. Cultivado a 37°.

B — Colonia de *Cl. Chauvoei.* Incidencia. Notar o meio deprimido sob a colonia.

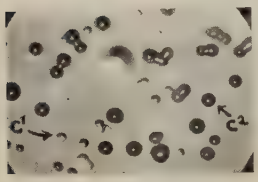
Colonias de *Cl. Chauvoei*



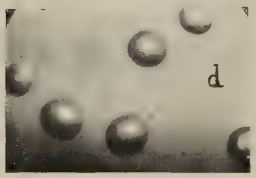
a) — Mq 27. Colonia opalescente regular



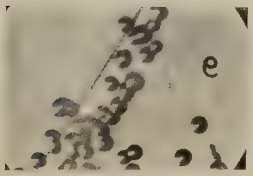
b) — Mq 27. Colonia hyalina elevada



c1) — Anaerobio 11. Colonia opalescente regular
c2) — Anaerobio 11. Colonia hyalina



d) — Mq 16. Colonia opalescente regular

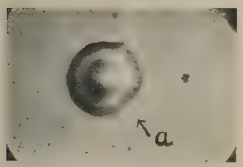


e) — Mq 23. Colonia hyalina elevada

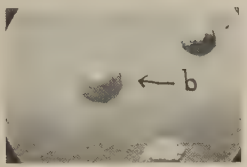
f1) — Mq 9. Colonia opalescente regular
f2) — Mq 9. Colonia hyalina elevada

g1) — Mq 1. Colonia opalescente regular
g2) — Mq 1. Colonia hyalina elevada

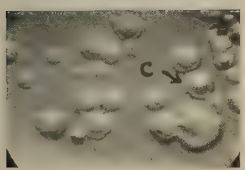
Colonias *Cl. Chauvoei*



a) — Mq 27. Plató de bordos lisos e centro elevado em botão



b) — Mq 27. Plató de bordos frisados e centro elevado em botão



c) — Mq 1. Borraina lisa, sulco e centro elevado em botão

d) — Mq 9. Borraina lisa, sulco frisado e centro elevado, apiculado

e) — Mq 16. Borraina de contorno irregular, sulco mais ou menos pronunciado, centro elevado em botão

f) — Mq 28. Colonia chata e lisa de bordos regulares e centro elevado em botão

NOTA SOBRE A ACANTHELLA DE "ONCICOLA ONCICOLA" (V. IHERING, 1892)

POR

C. Pereira

Trabalho do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 3 figuras no texto e estampas 41-42

No mez de Setembro do corrente anno vieram ter ao Serviço de Ornithopathologia do Instituto Biologico 3 exemplares de *Leptoptila verreauxi ochroptera* Pelzen, ave conhecida vulgarmente por «jurity», dos quaes um morreu logo após a chegada. Feita a necropsia, foi encontrado no tecido conjunctivo sub-cutaneo e na musculatura da carcassa certa quantidade de cystos alongados, de côr branca, medindo pouco mais de 2 mm. de comprimento; esses cystos foram remettidos para o Serviço de Zoologia, para identificação, tendo-se revelado serem formas immaturas de *Oncicola oncicola* (v. IHERING, 1892), *Gigantorhynchidae* HAMANN, 1892 pertencente á subfamilia *Prosthenorchinae* TRAVASSOS, 1915, parasito normal, quando adulto, do intestino delgado de Felideos selvagens da fauna neotropica, dos quaes refere TRAVASSOS achados em *Felis (Leopardus) onça* L. e *Felis (Catopuma) jaguarundi* FICH.

Deixamos aqui nossos agradecimentos aos Drs. J. REIS e P. NOBREGA pelo material gentilmente posto á nossa disposição, e ao Prof. L. TRAVASSOS pelos esclarecimentos com que nos auxiliou.

O encontro da acanthella de *O. oncicola* em uma ave demonstra o papel importante que pode ser desempenhado por esta classe animal no fechamento do cyclo evolutivo do helmintho, achado que contrasta com as observações anteriores sobre os hospedeiros intermediarios das especies do genero *Oncicola* TRAVASSOS, 1916, que tanto para *O. oncicola* na região neotropica como para *O. canis* (KAUPP, 1909), da região nearctica, esta parasitando o cão domestico e provavelmente parasito primitivo do «coyote», sempre são representados por especies diversas de Dasypodideos, nos quaes as larvas são encontradas com relativa frequencia tanto no tecido conjunctivo subcutaneo como na musculatura esqueletica.

Parece-nos interessante discutir a significação do papel desempenhado pelo vertebrado superior no cyclo evolutivo deste genero de Acanthocephalos.

E' conhecida a importancia dos insectos e crustaceos como hospedeiros intermediarios primarios dos Acanthocephalos cujo cyclo

evolutivo já é conhecido, bem como da geral desnecessidade, para o parasito, de intercalar um segundo hospedeiro intermediario no seu desenvolvimento de ovo a adulto. Parallelamente a esse facto, é tambem conhecido o caso de varios Acanthocephalos, como os do genero *Oligacanthorhynchus* TRAVASSOS, 1915, parasitos de aves ophiophagas e cujas acanthellas têm sido encontradas frequentemente na carcassa de varias especies de ophideos, phenomeno comparavel exactamente ao achado das acanthellas de especies do genero *Oncicola* em animaes stenothermos.

O cyclo evolutivo destes Acanthocephalos foi interpretado por TRAVASSOS como exigindo um hospedeiro intermediario, no caso de *Oncicola* representado por um *Dasypodidae,* que enguliria o ovo embryonado do helmintho; este, no tubo digestivo dos tatús libertaria a primeira larva, ou acanthor na denominação de VAN CLEAVE, a qual atravessaria a parede do tubo digestivo, indo encystar-se na carcassa do animal, onde se transformaria na larva, com os principaes caracteristicos taxonomicos do adulto, mas sem apresentar maturação sexual, e que corresponde á acanthella de VAN CLEAVE; finalmente, quando o tatú fosse comido pelo hospedeiro definitivo carnivoro, as acanthellas se desencystariam, fixar-se-iam na mucosa intestinal do hospedeiro definitivo, onde cresceriam e attingiriam a maturação sexual.

VAN CLEAVE discorda desse modo de interpretar os factos, achando que deve existir um hospedeiro primario infestavel passivamente pelo acanthor das especies de *Oncicola,* provavelmente um arthropodo, na cavidade geral do qual se daria a metamorphose da larva em acanthella, que permaneceria encystada; quando o arthropodo fosse comido pelo tatú, a acanthella seria libertada no intestino deste hospedeiro intermediario, e, migrando para a carcassa deste, iria encystar-se novamente, permanecendo nesse estado até que o tatú fosse comido pelo carnivoro hospedeiro definitivo, no intestino do qual se fixaria, attingindo o estado adulto.

Ora, parece-nos que as observações realizadas em Minnesota, U. S. A. por VAN CLEAVE a respeito da evolução de *Echinorhyncus thecatus* Linton, cujo hospedeiro primario é o amphipodo *Hyallela knickerbockeri,* servindo como hospedeiro definitivo os «bass», então criados artificialmente e nutridos com esses amphipodos, revelam a existencia apenas de um hospedeiro intermediario, como é de regra. Entretanto, verificou aquelle pesquisador que, quando o amphipodo ingerido não apresentava larvas no estadio infestante para o peixe, ellas tinham a faculdade de penetrar na cavidade geral de seu hospedeiro definitivo, onde encystavam, comportando-se portanto o peixe como um segundo hospedeiro intermediario, apezar de ser elle real-

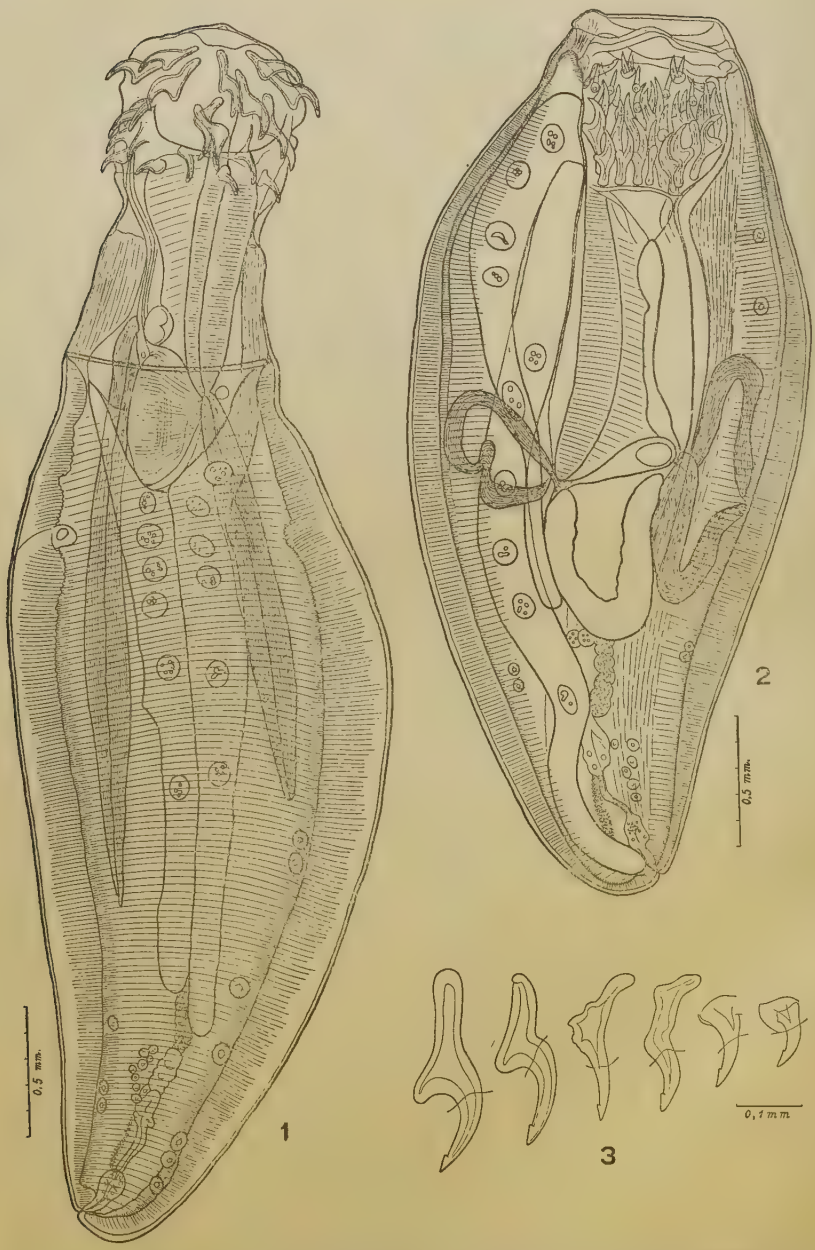
mente o hospedeiro definitivo. Ora, phenomenos dessa ordem consistem em simples «reencapsulamentos» da larva, os quaes, como é sabido, se dão sempre que a larva foi ter a um hospedeiro improprio ou, como evidenciou VAN CLEAVE, mesmo quando o hospedeiro é appropriado porém a larva não attingiu o estadio infestante para esse hospedeiro.

Portanto, parece-nos mesmo provavel a existencia de um arthropodo como hospedeiro intermediario e o unico necessario á evolução do helmintho; o vertebrado stenothermo, ao comer o arthropodo infestado, comportar-se-ia como o hospedeiro inapropriado, no qual as acanthellas teriam entretanto a possibilidade de se reencapsular, aguardando nova opportunidade de poderem attingir o intestino do hospedeiro definitivo.

Entretanto, se o Felideo pode infestar-se directamente ao comer o arthropodo infestado, os vertebrados que representariam o papel de legitimos «hospedeiros portadores» no conceito de TRAVASSOS em relação aos nematoides, ou «hospedeiros de espera», com o sentido geral dado por JOYEUX e BAER, seriam concentradores das larvas do parasito na natureza, podendo proporcionar aos carniceiros aos quaes servem de repasto, infestações pesadas do helmintho.

Cremos ser essa a maneira mais segura de interpretar o achado das acanthellas de *O. oncicola* em um Peristerideo. A jurity não deve procurar habitualmente as fezes dos felideos; sua provavelmente unica opportunidade de se infestar seria comendo insectos que puderam infestar-se ingerindo os ovos embryonados de *Oncicola* existentes nas fezes dos carniceiros. Estes, principalmente os de maior porte, não devem ter grande predilecção pelos habitos insectivoros, preferindo como alimento as caças mais consistentes, entre as quaes ás aves e aos mamiferos menores cabe o tributo mais pesado.

Em virtude mesmo dos habitos alimentares dos hospedeiros em jogo na realização do cyclo evolutivo de *O. oncicola,* é posssivel que caiba ao «hospedeiro portador» um papel que, do ponto de vista das vicissitudes de especificidade do parasito seria meramente accidental e portanto desnecessario, porém que, levando-se em conta os habitos alimentares rapidamente acima referidos para os hospedeiros vertebrados, seria de molde a conferir a mais alta importancia pratica á ave, como hospedeiro portador, por constituir ella o vehiculo mais seguramente capaz de attingir o hospedeiro definitivo. Realmente, é conhecida a avidez das onças pelas aves, especialmente as juritys.



Oncicola oncicola (v. IHERING, 1892). Fig. 1 — Acanthella retirada da membrana cystica e comprimida. Fig. 2 — Acanthella comprimida ainda no interior do cysto. Fig. 3 — Perfil dos seis typos de ganchos da proboscis.

Descripção das acanthellas de *O. oncicola* encontradas em *Leptoptila verreauxi ochroptera* Pelzen.

Figuras 1-3

Femeas — comprimento: exemplares comprimidos, proboscis envaginada, cerca de 3,3 mm.; exemplares comprimidos, proboscis desenvaginada, cerca de 4,5 mm. de comprimento total. Espessura, exemplares comprimidos de 1,2 a 1,4 mm.

Proboscis globosa, medindo cerca de 0,5 a 0,6 mm. de diametro; apresenta seis series obliquas de typos de ganchos mais ou menos differentes um do outro, cada typo alternando em quinconcio com o typo que se lhe segue immediatamente.. O typo mais distal consta de ganchos fortes de dupla raiz, sendo a raiz basal menos desenvolvida que a apical; o typo immediatamente posterior obedece á mesma construcção geral, apresentando entretanto a raiz apical bem mais desenvolvida, sendo elle no seu conjunto ligeiramente maior que o primeiro typo de ganchos; o 3.º typo de ganchos é bem mais fraco que os precedentes, tendo ambas as raizes pouco desenvolvidas, emittindo a raiz apical um prolongamento asymetrico grosseiro; o 4.º typo de ganchos é mais fragil um pouco, as raizes ainda menos desenvolvidas, notando-se entretanto augmento da expansão asymetrica da raiz apical; o 5.º e o 6.º typos de ganchos constitúem na realidade um typo unico, desprovido de raizes e semelhantes a aculeos de roseira, distinguindo-se por ligeiras differenças nas dimensões da lamina. Todos os ganchos apresentam um denticulo recurrente sobre o bordo concavo da lamina, proximo á extremidade apical desta.

Typos de ganchos	Distancia da extr. livre á raiz apical	Distancias entre as extrem. das raizes	Comprimento da expansão asymetrica
1.º Typo	0,25 mm.	0,14 mm.	—
2.º »	0,28 mm.	0,18 mm.	—
3.º »	0,19 mm.	0,09 mm.	0,06 mm.
4.º »	0,16 mm.	0,04 mm.	0,08 mm.
5.º »	Compr. da lamina: 0,10 mm.	—	—
6.º »	» » » : 0,08 mm.	—	—

Bainha da proboscis de paredes duplas, fortemente musculares, medindo cerca de 0,6 mm. de comprimento quando o proboscis está envaginada e 0,9 a 1,0 mm. quando evaginada, tendo de diametro cerca de 0,3 a 0,4 mm.; posteriormente, a bainha da proboscis está em relação com uma formação muscular que apresenta grande lacuna em seu interior, e que se torna ovoide com o maior eixo no mesmo sentido que o eixo do parasito, medindo cerca de 0,3 a 0,4 mm. de maior eixo. Na espessura da bainha da proboscis fica o ganglio nervoso central, de forma geral ovoide, medindo de 0,14 a 0,16 mm. de maior eixo por cerca de 0,10 mm. transversalmente; seu maior eixo é parallelo ao eixo do parasito quando a proboscis está evaginada, tornando-se-lhe quasi perpendicular quando ella está envaginada.

Das retinaculas destacam-se 2 pares que se inserem posteriormente á bainha da proboscis e que, dirigindo-se posterior e lateralmente, 2 a 2, vão terminar na parede do corpo, á altura de sua porção media.

Os lemniscos são espessos e longos; nos exemplares com a proboscis envaginada podem occupar todo o comprimento do corpo, ao passo que nos que a têm evaginada quasi attingem o ovejector.

Ligamento central posteriormente em relação com o ovejector, anteriormente inserindo-se na extremidade posterior da bainha da proboscis.

Ovejector medindo ao todo de 0,4 a 0,5 mm. de comprimento, apoiado sobre o ligamento contral; vulva sub-terminal.

Relações das acanthellas com os tecidos da ave.

Estampas 41-42

Como já dissemos, as acanthellas se encontram tanto no tecido conjunctivo subcutaneo como nos musculos esqueleticos.

Em ambos os casos, a larva se acha envolta por membrana cystica formada pelo hospedeiro e constituida por um conjunctivo denso, rico em cellulas.

Só tivemos opportunidade de estudar em cortes histologicos uma larva situada em tecido muscular estriado. Nos cortes, a membrana cystica se distingue facilmente da espessa camada chitinosa do parasito, á qual se justapõe.

O aspecto mais curioso encontrado em relação á acanthella é a existencia localizada de um pigmento, marron quando em granulos finos e isolados, preto se em massas mais compactas, espalhado discretamente ao redor do parasito, concentrado, porém, mais abundantemente, em relação a um dos polos da larva do acanthocephalo, em relação aproximadamente com a extremidade proboscidiana do parasito.

Este pigmento, como já assignalamos, é encontrado quasi exclusivamente em relação com a extremidade proboscidiana do parasito; sempre que elle occorre, não attinge nunca as fibras musculares, parecendo ficar confinado ás cellulas endotheliaes dos vasos e algumas vezes ás cellulas conjunctivas visinhas, de tal modo que nos cortes histologicos sua occorrencia lembra uma impregnação especifica da parede dos vasos, o que permitte evidenciar o trajecto dos mais finos capillares.

A escassez de material não nos permittiu o estudo da natureza desse pigmento nem de suas possiveis relações com o parasito; limitamo-nos por hora, apenas a assignalar o facto.

ABSTRACT

This paper deals with the spontaneous occurrence of the acanthella of Oncicola oncicola (v. IHERING, *1892*) *in the sub-cutaneous connective and skeletic muscles of the Peristerid bird Lepto-*

ptila verreauxi ochroptera PELZEN. *This finding is discussed and description is given of acanthella and of its connection with the host.*

BIBLIOGRAPHIA

BAYLIS, H. A. — 1929 — A Manual of Helminthology. BAILLERE, TINDALL and COX. Londres.

CLEAVE, H. J. van — 1920 — Notes on the Life-Cycle of two Species of Acanthocephala from Freshwater Fishes. *The Jl. of Parasitology,* **6**, 167 - 172.

CLEAVE, H. J. van — 1920 — Acanthocephala parasitic in the dog. *Ibidem,* **7**, 99 - 94.

CLEAVE, H. J. van — 1925 — The Larval Stages of Acanthocephala. *Ibidem* **21**, 435 - 436.

JOYEUX, Ch. et BAER, J. C. — 1934 — Les hôtes d'attente dans le cycle évolutif des helminthes. *Biol. Med.,* **24**, 482 - 506.

TRAVASSOS, L. — 1917 — Contrib. para o conhec. da fauna helminth. bras. VI. Revisão dos Acanthocephalos brasileiros. Parte I. Fam. *Gigantorhynchidae* HAMANN, 1892. *Mem. Inst. Osw. Cruz,* **9**, 5 - 62.

TRAVASSOS, L. — 1920 — Acanthocephalos dos animaes domesticos. *Rev. Veter. Zootech.,* **10**, 3 - 23.

TRAVASSOS, L. — 1926 — Contr. para o conhec. da fauna helminth. bras. XX. Rev. dos Acanthoc. bras. Parte II. Fam. *Echinorhynchidae* HAMANN, 1892, subfam. *Centrorhynchinae* TRAVASSOS, 1919. *Mem. Inst. Osw. Cruz,* **19**, 33 - 125.

———o———

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 41

Fig. A — Corte de musculo, proximo ao cysto, com grande quantidade de pigmento. Aug. 170×.

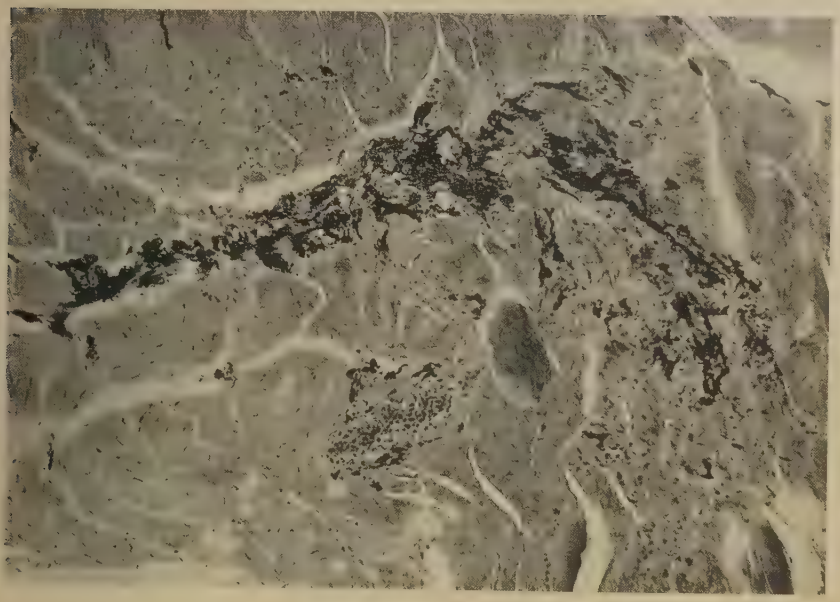
Fig. B — Corte apanhado tangencialmente á capsula do cysto. Aug. 120×.

Estampa 42

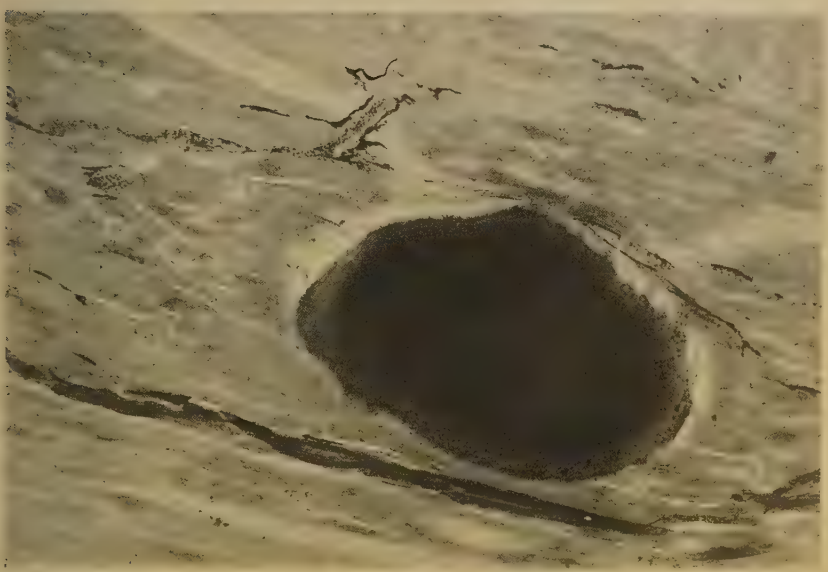
Fig. C — Capillares impregnados pelo pigmento, nas proximidades do cysto. Aug. 150×.

Fig. D — Detalhe de capillares impregnados pelo pigmento. Aug. 460×.

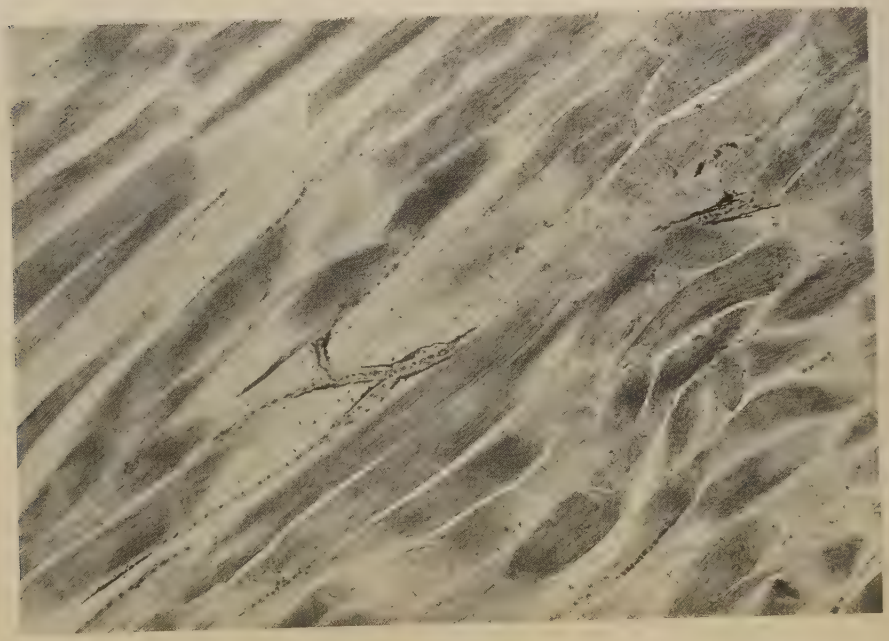
———o———



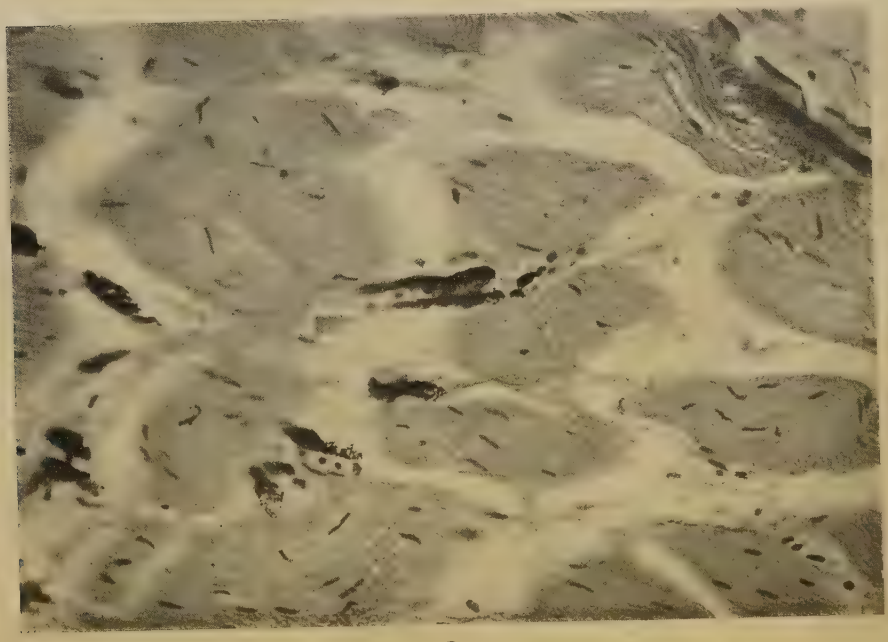
A



B



C



D

ESTUDOS SOBRE NEMATOIDES PARASITAS DA EMA (RHEA AMERICANA)

POR

Z. Vaz

Trabalho do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 20 figuras no texto

Proveniente do posto Zootechnico recebemos, para autopsia, por gentileza do Major Romão Junqueira, um exemplar de *Rhea americana* (Ema), nascida e criada no referido posto, localisado no parque de Agua Branca.

A' autopsia encontramos duas interessantes especies de nematoides, um *Spiruridae* e um *Strongylidae* que constituem o objecto do presente trabalho.

A especie de *Spiruridae* é muito proxima de *Spiroptera uncinipenis* MOLIN, 1860, que DIESING (1861) transferiu para o genero *Cheilospirura,* STOSSICH (1897) e LINSTOW (1899) repõe no genero *Spiroptera,* RAILLET & HENRY (1911) incluem no genero *Spirura,* GEDOELST (1919) no genero *Gilsonia,* GENDRE (1922) no genero *Hadjelia,* suggerindo depois (1923) relações com *Habronema,* CRAM (1927) no genero *Spirura* e finalmente WALTON (1927) ao rever o material da collecção de LEIDY collocou no genero *Habronema.*

A especie que encontramos, como já dissemos muito se assemelha á especie de MOLIN e a principio a identificamos com ella; mas um estudo mais detalhado mostrou differenças bastantes para justificar a creação de uma nova especie e são as seguintes: 1) dimensões do espiculo menor que são de 0,70 á 0,72 mm. na nossa especie e de 0,3 a 0,42 mm. na especie de MOLIN; 2) presença de gubernaculo em nossa especie; 3) ausencia de esporão chitinoso na margem esterna dos labios lateraes em nosso material; 4) posição da vulva que em nossa especie está localisada no meio do corpo e em *H. uncinipenis* fica pouco acima da união do quarto posterior com os $^3/_4$ anteriores; 5) dimensões totaes que são maiores em nossa especie.

Ao procurar verificar a exacta inclusão generica da nova especie, procedemos a principio como WALTON fizera com *H. uncinipenis* incluindo-a no genero *Habronema;* chamou-nos porém a attenção a forma dos labios lateraes e a existencia de interlabios dorsal e ventral que não existem na especie typo do genero *Habronema* que é *H. muscae* (CARTER, 1861). Revendo cuidadosamente a descripção de todas as

especies do genero, verificamos que umas têm interlabio verdadeiro e outras não, facto aliás já discutido por Li a proposito de *H. dipterum*.

Parece-nos pois inteiramente razoavel a proposição de um novo genero para os *Habronema* com interlabios, como fez Li (1934), creando o genero *Sicarius*, cuja especie typo é *S. dipterum* (Popowa, 1927) Syn. *H. dipterum*.

Damos a seguir a diagnose do genero *Sicarius* e a lista das especies do genero *Habronema* que a nossso ver devem passar para o genero *Sicarius* por possuirem verdadeiros interlabios.

Sicarius Li, 1934.

Diagnose: — *Habroneminae*. Bocca com dois labios lateraes e *dois interlabios: um dorsal* e *outro ventral*. Corpo com ou sem azas lateraes; papillas cervicaes presentes ou não; vestibulo presente, chitinizado; esophago dividido em duas porções. *Macho:* Cauda enrolada em espiral; azas caudaes presentes; com 6 papillas pedunculadas: quatro pré anaes e duas post anaes; espiculos desiguaes na forma e dimensões; gubernaculo presente ou ausente; ovoviviparos; ovos com ou sem espessamentos polares. Parasitos do estomago de aves.

Especie typo:

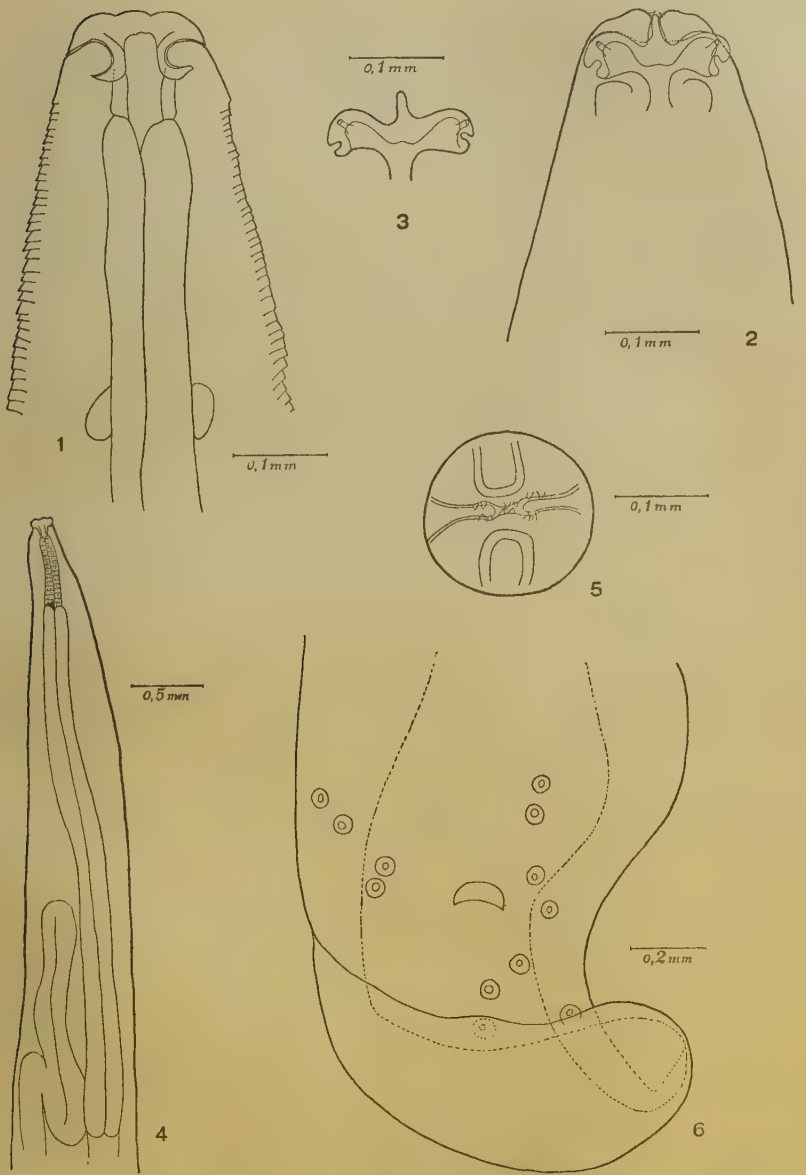
Sicarius dipterum (Popowa, 1927) Li, 1934. *in Upupa epops*.

Outras especies:

Sicarius uncinipenis (Molin, 1860). *in Rhea americana*.

Syn. *Spiroptera uncinipenis* Molin, 1860.
Cheilospirura uncinipenis (Molin, 1860) Diesing, 1861.
Spiroptera uncinipenis Molin, 1860 Stossich, 1897.
Spiroptera uncinipenis Molin, 1860 Linstow, 1899.
Spirura uncinipenis (Molin, 1860) Raillet & Henry, 1911.
Gilsonia uncinipenis (Molin, 1860) Gedoelst, 1919.
Hadjelia uncinipenis (Molin, 1860) Gendre, 1922.
Spirura uncinipenis (Molin, 1860) Cram, 1927.
Habronema uncinipenis (Molin, 1860) Walton, 1927.

S. nobregai n. sp. in *Rhea americana*.
S. incerta (Smith, 1908). in *Bolborhynchus lineola* etc.
S. leptotera (Rud., 1819). in *Falco buteo* etc.
S. longispicula (Walton, 1927). in *Strix nebulosa*.
S. magnilabiata (Maplestone, 1932) in *Polioaetus plumbeus*.
S. monoptera (Gendre, 1923). in «Rapace noturne».
S. spinosa (Gendre, 1923). in *Falco tinunculus*.
S. tulostoma (Hemp. & Ehrenb.). in «Vultures».
S. unilaterale (Molin, 1860). in *Neophron perenopterus*.



Sicarius nobregai n. sp. Fig. 1 — Extremidade anterior: labio lateral e vestibulo. Fig. 2 — Extremidade anterior: vista dorsal. Fig. 3 — Labio dorsal. Fig. 4 — Porção anterior do corpo: esophago. Fig. 5 — Bocca vista de frente. Fig. 6 — Extremidade posterior do macho.

Habronema DIESING, 1861.

Diagnose: — *Habroneminae;* Bocca com dois labios lateraes geralmente trilobados, *sem interlabios dorsal* e *ventral;* aza lateral em um ou ambos os lados do corpo; papillas cervicaes presentes; vestibulo presente, chitinizado; esophago formado de duas porções. *Macho:* cauda enrolada em espiral; azas caudaes presentes; com 6 pares de papillas pedunculadas: quatro pre-anaes e duas post-anaes; espiculos desiguaes na forma e dimensões; gubernaculo presente. *Femea:* vulva proximo do meio do corpo; ovoviviparos; ovos de casca fina ou grossa.

Especie typo:

Habronema muscae (CARTER, 1861). in equinos.

Outras especies:

Mammiferos

H. chevreuxi SEURAT, 1913. in *Felis ocreata.*
H. grimaldiae SEURAT, 1913. in *Vulpes atlantica.*
H. megastoma (RUD. 1819). in equinos.
H. microstoma (SCHNEIDER, 1866). in equinos.
H. nouvelli SEURAT, 1915. in *Genetta* sp.
H. skrjabini TSCHERNIKOWA, 1934. in *Prionailurus cuptilura.*
H. whitei MONNIG, 1931. in *Suricata suricata.*
H. zebrae THEILER, 1923. in Zebra.

Aves

H. asymetrica MAPLESTONE, 1932. in *Circus micrurus.*
H. casuarii MAPL., 1932. in *Casuarius bicarunculatus.*
H. circi LI, 1934. in *Circus cyaneus.*
H. colaptes WALTON, 1923 in *Colaptes* sp.
H. diesingi MAPLESTONE, 1932. in *Acryllium vulturinum.*
H. euplocami MAPLESTONE, 1930. in *Euplocamus leucomelanus.*
H. ficheuri SEURAT, 1915. in *Bubulcus lucidus.*
H. imbricata MAPLESTONE, 1930. in *Scops pennatus.*
H. indica MAPLESTONE, 1929. in *Coracias indica.*
H. longistriata MOLIN, 1859. in *Picus campestris* e *P. jumana.*
H. mansioni SEURAT, 1914. in *Buteo vulgaris.*
H. murrayi ORTLEPP, 1934. in *Tyto alba* e *T. capensis.*
H. pileata WALTON, 1927. in *Phloeotomus pileatus.*
H. seurati SKRJABIN, 1917. in *Falco* sp.
H. urophasiana WEHR, 1931. in *Centrocercus urophasianus.*

Sicarius nobregai n. sp.

Figuras 1-11

Macho: comprimento 25 a 28 mm.; largura 0,6 a 0,7 mm.
Femea: » 33 a 36 mm.; » 0,7 a 0,9 mm.

Descripção: Nematoides de colorido vermelho; corpo cilindrico, estreitando-se gradualmente para ambas as extremidades, apresentando a femea um ligeiro alargamento do corpo ao nivel da vulva. Não conseguimos verificar a presença de azas cerviçaes; WALTON descreve em *S. uncinipenis* uma curta aza cervical no lado espessado terminando ao nivel da união das duas porções do esophago.

Cuticula estriada transversalmente, sendo a estriação mais accentuada na parte anterior do corpo. Papilas cervicaes ausentes.

A bocca é delimitada por dois labios lateraes e dois interlabios um dorsal e outro ventral. Os labios lateraes (Fig. 1) são estreitos na base, alargando-se para a extremidade livre em direcção ás faces dorsal e ventral. O bordo livre apresenta uma ligeira trilobulação e, no bordo interno (Fig. 5) os labios lateraes apresentam cada um 3 pares de pequeninos dentes, dois em cada lobulo. interlabios dorsal (Fig. 2 e 3) e ventral, apresentam uma base muito larga que se estende para as faces lateraes e que se articula com a parte estreitada dos labios lateraes; o lobo mediano dos interlabios é muito estreito e se encaixa entre os labios lateraes. Cada interlabio tem na porção basal duas papilas, uma de cada lado.

A capsula buccal, medida apenas a porção chitinosa, méde nas femeas 0,074 mm. de comprimento por 0,041 mm de largura e nos machos 0,062 mm. de comprimento por 0,037 mm de largura.

O esophago (Fig. 4) é dividido em duas porções medindo a primeira 0,4 a 0,42 mm. e a segunda 3,22 a 3,4 mm. nos machos e 3,4 a 3,7 mm. nas femeas.

O anel nervoso está situado na primeira porção do esophago, a mais ou menos 0,42 mm. da extremidade anterior.

Macho: Os machos têm a parte posterior do corpo enrolada em espiral e provida de longas azas caudaes com papillas; as papillas são em numero de 6 pares das quaes 4 pré-anaes e duas post-anaes. Não pudemos verificar a presença de pequenas papillas na extremidade caudal descriptas por WALTON em *S. uncinipenis*.

Os espiculos (Fig. 7) são desiguaes na forma e dimensões; o maior méde 3,05 a 3,17 mm. de comprimento e o menor 0,7 a 0,72 mm. sendo provido de uma ligeira saliencia na extremidade distal. Como se póde ver nas dimensões, o espiculo maior é 4 a 4,5 vezes mais longo que o menor; em *S. uncinipenis* o espiculo maior é 7 a 8 vezes mais longo que o menor.

O gubernaculo é bem visivel (Fig. 8) apresentando-se como uma peça chitinosa, de forma irregular, escavada em uma das faces formando uma goteira; mede 0,1 mm. de comprimento.

A abertura da cloaca está situada a mais ou menos 1 mm. da extremidade posterior. A alça superior do testiculo vae até um pouco acima da extremidade posterior do esophago.

Femea: A vulva (Fig. 9) abre-se no meio do corpo, mais ou menos a 16,3 á 16,5 mm. da extremidade posterior, notando-se uma ligeira espansão da cuticula nesse nivel e, como já dissemos, a largura do corpo é um pouco mais accentuada.

A vagina é musculosa e dirigida para traz e méde aproximadamente 2,3 a 2,5 mm. de extensão. Nos exemplares bem maduros quasi todo o corpo é occupado pelas alças uterinas que são cheias de ovos embryonados. Os ovos (Fig. 11) são embryonados no momento da postura; são de forma eliptica,

de casca muito grossa e apresentam um espessamento da casca em cada polo, o que lhes dá um aspecto muito caracteristico; WALTON não assignala essa particularidade ao descrever *S. uncinipenis*, mas LINSTOW (1899) della faz referencias; os ovos medem 0,047 × 0,025 mm.

A cauda da femea (Fig. 10) é arredondada, medindo 0,26 mm. de comprimento.

Hospedador: Rhea americana — Ema.

Habitat: sob a mucosa da moela e da 1.ª parte do duodeno.

Typo: colleção helminthologica do Instituto Biologico de São Paulo, Brasil.

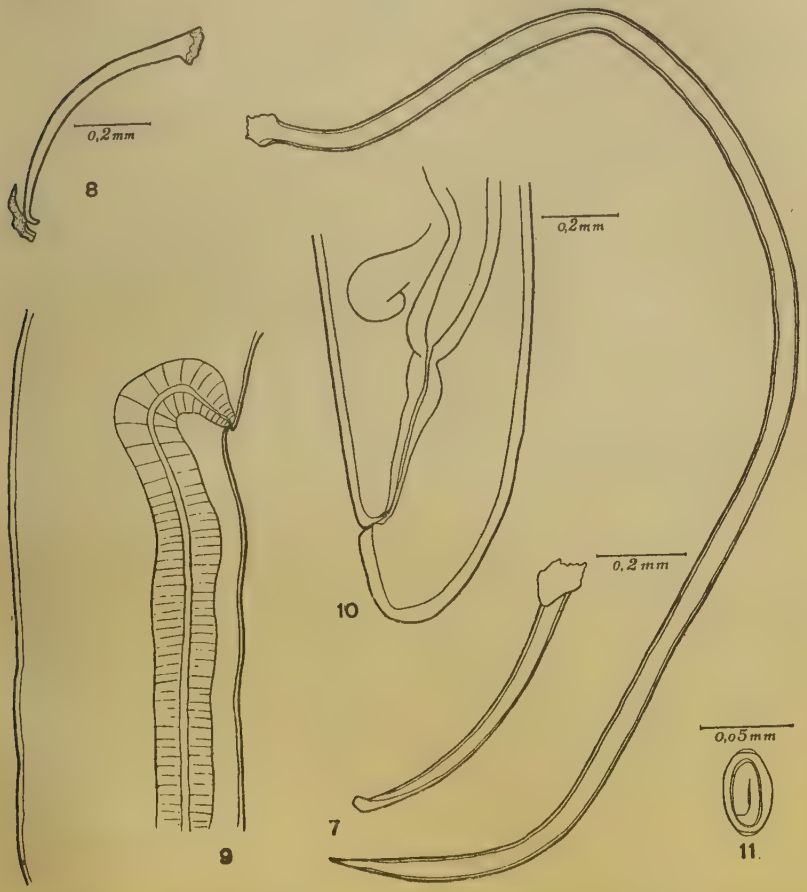
O nome da especie é dado em homenagem ao Dr. Paulo C. Nobrega, Ornithopathologista do Instituto Biologico.

Dimensões em mm. das especies do gen. *Sicarius* parasitas de *Rhea americana*.

	S. uncinipenis (Molin, 1860) segundo Walton		*S. nobregai* n. sp.	
	Macho	Femea	Macho	Femea
Comprimento	20	25	25 - 28	33 - 36
Largura	0,7	0,75	0,6 - 0,7	0,7 - 0,9
Esophago 1.ª porção	0,42 - 0,45	0,39 - 0,41	0,4 - 0,42	0,42 - 0,45
Esophago 2.ª porção	2,6 - 2,9	3,25 - 3,55	3,22 - 3,7	3,4 - 3,9
Pharynge comprimento	0,12 - 0,13	0,12 - 0,14	0,062	0,074
Pharynge largura	—	—	0,037	0,041
Anel nervoso da extr. anterior	0,31 - 0,40		0,42	
Vulva da extr. posterior	—	6,6 - 7,1	—	16,3 - 16,5
Vagina	—	0,5 - 0,95	—	2,3 - 2,5
Anus da extr. posterior	0,75 - 0,80	0,26	1	0,26
Espiculo maior	2,4 - 2,65	—	3 - 3,17	—
Espiculo menor	0,3 - 0,42	—	0,7 - 0,72	—
Gubernaculo	ausente	—	0,1	—
Ovos	—	0,045 - 0,050 x 0,024 - 0,026	—	0,047 x 0,025

Quanto ao *Strongylidae*, verificamos pertencer ao genero *Deletrocephalus* cuja especie typo *(D. dimidiatus* MOLIN) foi exhaustivamente estudada por TRAVASSOS, de material proveniente do Rio Grande do Sul, collecionado por CESAR PINTO. No trabalho de TRAVASSOS o autor faz um completo apanhado historico, que nos excusamos de repetir, e discute a possibilidade de existencia de duas especies; o ma-

terial que examinou não lhe permittia chegar a essa conclusão, que todavia não foi excluida e, em communicação particular, disse-nos da existencia de duas especies.



Sicarius nobregai n. sp. Fig. 7 — Espiculos. Fig. 8 — Espiculo menor e gubernaculo. Fig. 9 — Vulva e vagina. Fig. 10 — Cauda da femea. Fig. 11 — Ovo.

O material que examinamos mostrou logo differenças nitidas da especie de Diesing, desde o aspecto da capsula buccal; em relação ao apparelho genital verificamos que os espiculos dos machos mediam 4,5 a 5 mm. ao passo que em *D. dimidiatus* medem 0,9 a 1 mm. portanto 5 vezes maiores; nas femeas a vagina mede 3 mm. em nosso material e mais ou menos 0,2 á 0,3 mm. em *D. dimidiatus*.

Devemos resaltar aqui um detalhe interessante: SCHNEIDER, (1866) ao redescrever a especie de DIESING, que collocou no genero *Strongylus,* diz que os espiculos medem 5 mm. de comprimento; esse facto e mais o aspecto da capsula buccal que representa no seu livro, faz-nos suppor que SCHNEIDER trabalhou com material da especie que vamos descrever e não da especie de DIESING.

Deletrocephalus cesarpintoi n. sp.

Figuras 12-20

Macho: comprimento 14 á 16 mm.; largura 0,46 á 0,50 mm.
Femea: » 18 á 22 mm.; » 0, 5 á 0, 6 mm.

Descripção: Corpo fusiforme, de colorido esbranquiçado, revestido por uma cuticula com estriação muito delicada. A extremidade anterior (Fig. 12), ao nivel da região cephalica, apresenta uma ligeira dilatação pouco antes da bocca, correspondente ás faces dorsal e ventral; portanto só visivel quando se examina o nematoide pela face lateral.

Papilas cervicaes (Fig. 14) mal visiveis, situadas no macho a 0,8 mm. da extremidade anterior e na femea a 1 mm. da mesma extremidade.

Póro excretor (Fig. 14) tambem difficil de observar, localisando-se um pouco acima das papilas mais ou menos a 0,7 mm. no macho e 0,88 mm. na femea, da extremidade anterior.

A bocca é delimitada por 6 membranas cuticulares, com delicada estriação longitudinal apresentando uma papilla cada uma.

A capsula buccal propriamente dita é limitada superiormente por um rebordo chitinoso, forte, ondeado, apresentando pequeninas placas de reforço no sentido longitudinal. Do rebordo da capsula buccal partem 8 fortes peças chitinosas dispostas em 4 pares: um par em cada face lateral e 1 par no lado dorsal e outro no ventral. Uma das peças dos lados dorsal e ventral apresenta um espessamento na margem externa (Fig. 12), correspondente á dilatação cephalica observavel esternamente nos lados dorsal e ventral. Esse espessamento aliás está muito nitido na figura em que SCHNEIDER representa a especie que diz ser o *D. dimidiatus* mas que TRAVASSOS não descreve nem desenha Parece-nos por esse e outros motivos que SCHNEIDER trabalhou com material da especie que estamos descrevendo.

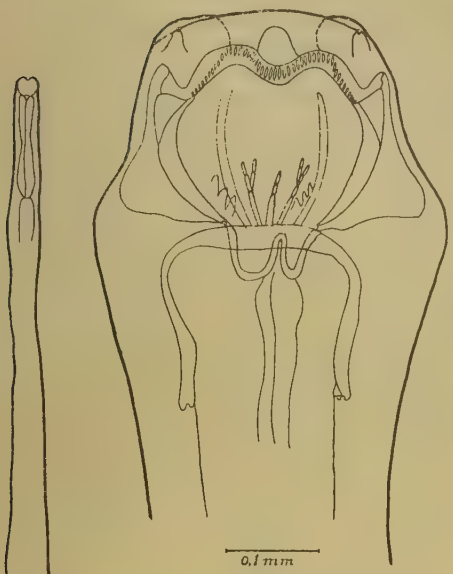
Afóra essas peças fundamentaes, partem do fundo da capsula 15 a 16 cristas longitudinaes que acompanham a parede da capsula sem attingir o rebordo chitinoso superior.

Dessas cristas chitinosas, existem 2 maiores em cada face lateral e uma mediana nas faces dorsal e ventral que quasi attingem o rebordo superior. As cristas são denteadas, emittindo pequenas saliencias para o interior da capsula buccal.

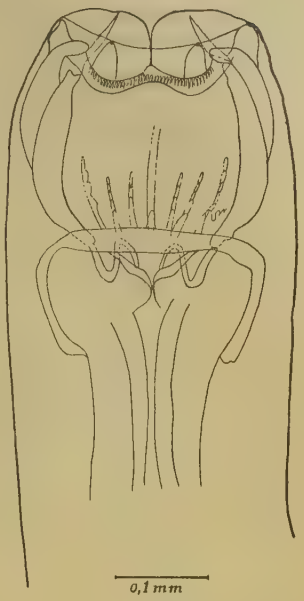
Do fundo da capsula buccal saem tambem cordões chitinosos recurrentes que penetram na porção inicial do esophago.

As dimensões da capsula buccal variam entre 0,20 a 0,22 mm. de comprimento por 0,26 a 0,28 mm. de largura.

O esophago (Fig. 14) é de natureza muscular, mais ou menos claviforme alargando-se gradualmente para a extremidade posterior, apresentando



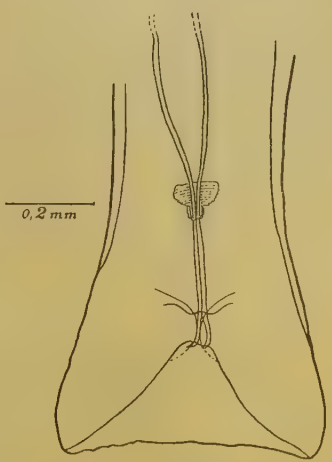
12



13

15

14

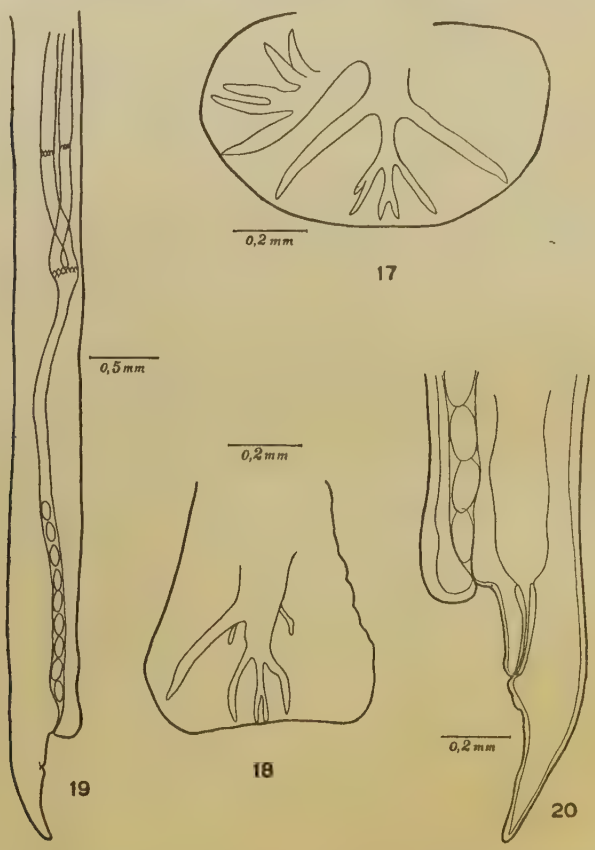


16

Deletrocephalus cesarpintoi n. sp. Fig. 12 — Extremidade anterior: vista lateral. Fig. 13 — Extremidade anterior: vista ventral. Fig. 14 — Extremidade anterior: esophago, papillas cervicaes, póro excretor e anel nervoso. Fig. 15 — Macho total: espiculos. Fig. 16 — Extremidade posterior do macho: gubernaculo.

porém na extremidade anterior uma ligeira dilatação que é revestida externamente por um capuz chitinoso bastante espesso, que alarga ainda mais a extremidade.

Essa formação, que parece não existir na especie de DIESING, pois TRAVASSOS não a descreve nem representa, foi assignalada nitidamente na figura feita por SCHNEIDER em sua «Monographie der Nematoden» (Taf. VIII. fig. 14).



Deletrocephalus cesarpintoi n. sp. Fig. 17 — Bolsa copuladora. Fig. 18 — Raio dorsal externo anomalo. Fig. 19 — Parte posterior da femea: vestibulo e vagina. Fig. 20 — Extremidade posterior da femea: vulva e anus.

Quanto ás dimensões, o esophago tem de comprimento 1,41 a 1,70 mm. nas femeas e 1,30 a 1,50 mm. nos machos; a largura maxima, medida proximo da extremidade posterior é mais ou menos de 0,22 mm. nos machos e 0,24 mm. nas femeas.

Macho: Os machos têm a bolsa copuladora (Figs. 16 e 17) campanuliforme, com os lobos lateraes bastante unidos ventralmente.

Dos raios da bolsa copuladora (Fig. 17) o ventro-ventral e o ventro-lateral são pequenos, divergentes e não attingem o bordo livre. Os lateraes nascem do mesmo tronco do qual se destaca um ramo commum que forma os lateraes anterior e medio; o lateral posterior é o mais desenvolvido dos lateraes, attingindo o bordo livre da bolsa. O dorsal esterno vae até perto do bordo livre. O dorsal propriamente dito apresenta um ramo lateral bem desenvolvido e é bifurcado proximo da terminação. São communs as anomalias da bolsa, registradas já por SCHNEIDER, e documentadas por TRAVASSOS para o *D. dimidiatus*. Dessas anomalias a mais notavel que encontramos (Fig. 18) foi a ausencia absoluta em um exemplar, do raio dorsal externo do lado esquerdo da bolsa, emquanto o do lado oposto era de desenvolvimento normal. Além dessa, outras taes como ramusculos no dorsal externo, dois ramos lateraes, em vez de um, no dorsal, etc.

Os espiculos (Figs. 15 e 16) são longos e finos, com a extremidade distal recurvada, aproximadamente iguaes na forma e dimensões, medindo 4,6 a 5 mm. de comprimento, ou seja a terça parte mais ou menos do comprimento do corpo; em *D. dimidiatus* as dimensões dos espiculos são de mais ou menos 1 mm.

O gubernaculo (Fig. 16) é do mesmo typo que o descripto por TRAVASSOS para *D. dimidiatus* i. é pouco visivel, mal chitinisado, constituido por um nucleo de chitinisação do qual partem filamentos chitinosos delicados, dispostos radialmente.

A cloaca abre-se a 0,26 - 0,28 mm. da extremidade posterior.

Femea: Vulva (Figs. 19 e 20) situada proximo da extremidade posterior, pouco acima do anus; nota-se uma saliencia do corpo bastante accentuada e daí por diante o corpo estreita-se bruscamente e termina em ponta conica. A distancia da vulva á extremidade posterior é de 0,65 a 0,70 mm. O ovejector (Fig. 19) é muito longo e constituido por uma vagina de grandes dimensões que méde mais ou menos 3 mm. sendo portanto quasi 10 vezes maior que em *D. dimidiatus;* á vagina vêm ter dois vestibulos relativamente curtos, medindo 0,88 mm. de comprimento; como se vê as dimensões dos vestibulos são aproximadamente iguaes ás observadas na especie de DIESING. Os uteros são parallelos, dirigidos para cima, sendo pois evidentemente prodelphos. Os ovos medem 0,147 a 0,156 mm. × 0,73 mm.

O anus está situado a 0,36 - 0,44 mm. da extremidade posterior.

Hospedador: Rhea americana LATH.; nome vulgar: Ema.

Localisação: Intestino delgado.

Distribuição Geographica: Estado de S. Paulo — Brasil.

Typos e *Paratypos:* Collecção helminthologica do Instituto Biologico de S. Paulo, Brasil.

O nome da especie é dedicado, em homenagem, ao nosso mestre e grande parasitologista Prof. CESAR PINTO, que tem dado o melhor de seus esforços á elucidação dos problemas de parasitologia no Brasil.

Dimensões em mm. das especies do gen. *Deletrocephalus* parasitas de *Rhea americana*.

	D. dimidiatus Dies. segundo Travassos		*D. cesarpintoi* n. sp.	
	Macho	Femea	Macho	Femea
Comprimento	9,5 - 12	13 - 15	14 - 16	18 - 22
Largura	0,35 - 0,42	0,36 - 0,40	0,45 - 0,50	0,5 - 0,6
Esophago Comprimento	0,64 - 0,74		1,30 - 1,50	1,40 - 1,70
Esophago Largura	0,13 - 0,14		0,22	0,24
Capsula buccal Comprimento	0,072 - 0,104		0,20 - 0,22	
Capsula buccal Largura	0,096 - 0,136		0,26 - 0,28	
Papillas cervicaes da extr. anterior	0,32 - 0,42		0,8	1
Póro excretor da extr. anterior	0,25 - 0,35		0,7	0,88
Vulva da extr. posterior		0,38 - 0,43		0,65 - 0,70
Vagina		0,25 - 0,3		3
Vestibulos		0,64 - 0,78		0,88
Anus		0,21 - 0,22		0,36 - 0,44
Espiculos	0,9 - 1			4,5 - 5
Ovos		0,160 - 0,168 x 0,072 - 0,080		0,147 - 0,156 x 0,070 - 0,073

Como se póde ver no quadro, é bem possivel que as duas especies correspondam ás variedades *major* e *minor* que MOLIN considerou em *D. dimidiatus*. O que não nos parece deixar duvida é que SCHNEIDER, em sua monographia, considerou como *D. dimidiatus* a especie que ora descrevemos.

ABSTRACT

This paper deals with tow new parasitic nematodes from Rhea americana LATH.: *Sicarius nobregai*, n. sp. and *Deletrocephalus cesarpintoi* n. sp.

The author agrees with LI *(1934) that proposed a new genus Sicarius to include Habronema species provided with true dorsal and ventral interlip in addition to the lateral lips; this condition is not verified in H. muscae, type of the genus as well as in many other species that show only lateral lips.*

S. nobregai n. sp. is closely related to S. uncinipenis (MOLIN, *1860), that* WALTON *(1927) has included in the genus Habronema, but differs from it in the length of the small spicule, in the position of the vulva, presence of gubernaculum and in the total*

length of the body, as the table of measurements in the Portuguese text shows.

Delectrocepalus cesarpintoi n. sp. differs from D. dimidiatus DIESING *by the following characters: length of the spicules, length of the vagina, total length of the body and structure of the mouth capsule.*

It seems to the writer that SCHNEIDER *was really dealing with material of D. cesarpintoi, when he redescribed D. dimidiatus; in the «Monographie der Nematoden»,* SCHNEIDER *states that the spicules of D. dimidiatus are 5 mm. long but in this species the spicules measure only 0,95 — 1 mm.* (TRAVASSOS, CRAM, *etc.). The figures by* SCHNEIDER *clearly show that the structure of the mouth capsule of D. cesarpintoi is very different from that of D. dimidiatus.*

BIBLIOGRAPHIA

CRAM, E. B. — 1927 — Bird Parasites of the Nematode Suborders Strongylata, Ascaridata, and Spirurata. U. S. Nat. Mus. Bull. **140**, 1-465.

DIESING, C. M. — 1851 — Systema helminthum, Berlim. **2**, 297.

LI, H. C. — 1934 — Report on a collection of parasitic nematodes, mainly from North China. Part II. Spiruroidea. Trans. Am. Micr. Soc. Menasha. **53**, 174-195.

MAPLESTONE, P. A. — 1929 — Two New Species of nematodes from Indian Hosts. Records Ind. Mus. Calcutta. **31**, pt. 2, 90-92.

MAPLESTONE, P. A. — 1930 — Parasitic Nematodes obtained from Animals dying in the Calcutta Zoological Gardens. Rec. Ind. Mus. Calcutta, **32**, pt. 4, 403-411.

MAPLESTONE, P. A. — 1932 — Parasitic Nematodes obtained from Animals dying in the Calcutta Zoological Gardens. Rec Ind. Mus. Calcutta, **34**, pt. 3, 238-248.

MÖNNIG, B. A. — 1931 — Two New Nematodes from the Suricat (Viverridae). 17 th. Report Dir. Vet. Serv. An. Ind. Onderstepoort. pp. 277-282.

ORTLEPP, M. A. — 1934 — On *Habronema murrayi* sp. n. from the Barn Owl — *Tyto alba.* Onderstep. Jl. Vet. Sci. An. Ind., **3**, 351-355.

POPOWA, K. A. — 1927 — Ein neuer Nematode des Wiedehopfes (*Upupa epops* L.) *Habronema dipterum* n. sp. (in Russian with German Résumé) Sammlung Helminth. Arbeiten K. I. Skrjabin gewidmet. Moscow, pp. 180-185.

SCHNEIDER, A. — 1866 — Monographie der Nematoden. Berlin, p. 136.

SEURAT, L. G. — 1913 — Sur deux Spiropteres du Chat ganté *(Felis ocreata)* C. R. Soc. Biol. Paris. **74**, 676.

SEURAT, L. G. — 1915 — Sur deux noveaux Spiropteres des carnivores. C. R. Soc. Biol. Paris. **78**, 157.

THEILER, G. — 1923 — The Strongylids and other Nematodes parasitic in the Intestinal Tract of South African Equines. Pretoria. These. pp. 1-175.

TRAVASSOS, L. — 1933 — Contribuição ao conhecimento do «Deletrocephalus dimidiatus Diesing» 1851, parasito de «Rhea americana» Lath. Arch. Esc. Sup. Agric. Med. Vet. Rio de Janeiro. **10**, 89-98.

TSCHERNIKOWA, C. — 1934 — Un Nouveau Nematode: *Habronema skrjabini* n. sp. du chat sauvage. Ann. Paras. Hum. Comp. Paris. **12**, 29-34.

WALTON, A. C. — 1927 — A Revision of the Nematodes of the Leidy Collections. Proc. Ac. Nat. Sci. Philadelphia. **79**, 49-163.

WEHR, E. E. — 1931 — A New Species of Nematode Worm from the Sage Grouse. Proc. U. S. Nat. Mus. Washington. **79**, art. 3, 1-3.

WEHR, E. E. — 1933 — A New Nematode from the Rhea. Proc. U. S. Nat. Mus. Washington. **82**, art. 17, 1-7.

YORKE & MAPLESTONE, — 1926 — The Nematode parasites of Vertebrates. London.

———o———

"HEMPELIA HEMPELI" n. g. n. sp. DE NEMATOIDE ESPIRURIDEO PARASITA DOS OLHOS DA PERDIZ E CODORNA. (RYNCHOTUS RUFESCENS E NOTHURA MACULOSA)

POR

Z. Vaz

Trabalho do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 5 figuras no texto

Em trabalho anterior, ao redescrever *Tetracheilonema quadrilabiatum,* filaria da cavidade geral da perdiz e da codorna, o autor chegara á conclusão de que não era razoavel considerar *Filaria tinami variegati* MOLIN, como synonimo daquella especie, como fizera DIESING. Isso em virtude das grandes dimensões de *T. quadrilabiatum,* quer de comprimento quer de largura, não podendo assim viver no olho.

Por gentileza do Dr. A. HEMPEL tivemos oportunidade de examinar bom e abundante material de um nematoide do olho de *Nothura maculosa* (codorna) e *Rynchotus rufescens* (perdiz) proveniente de Itararé, no Estado de S. Paulo; praticamos ao todo 47 exames, dos quaes 15 em perdizes e 32 em codornas. Das 15 perdizes, 11 estavam parasitadas, o que dá uma porcentagem de pouco mais de 70 %. Das 32 codornas, 17 apresentavam o nematoide do olho, numa porcentagem de pouco mais de 50 %.

De posse desse material pensamos logo em *Filaria tinami variegati;* mas esse nome foi dado por MOLIN a um nematoide, baseando-se em um só exemplar femea em mau estado de conservação. O material fôra collecionado por NATTERER, na região amazonica, no olho de *Crypturus variegatus (Tinamus variegati)* e MOLIN não faz a menor descripção nem dá figura alguma. Portanto, *F. tinami variegati* deve ser considerado *nomen nudum* e não temos elementos para suppor que nosso material deve ser identico áquelle de que MOLIN só observou uma femea, pois os hospedadores são diferentes e a distribuição geographica tambem.

A especie que estudamos, pertence á familia *Thelaziidae* e deve constituir o typo de um novo genero, *Hempelia,* intermediario entre *Oxyspirura* e *Thelazia,* pois tem a estructura da bocca igual á de *Thelazia;* mas a vulva está localizada na extremidade posterior, junto do anus, como em *Oxyspirura;* distingue-se deste genero pela estructura da capsula buccal.

Hempelia n. g.

Thelaziidae: Bocca sem labios aparentes seguida de pequeno vestibulo (como em *Thelazia)* de paredes pouco chitinizadas; dois pares de papillas cephalicas e quatro pares submedianos; com pequenas dilatações cutilares cephalicas; esophago cylindrico, não dividido em duas porções. *Macho:* cauda enrolada, sem azas caudaes; com poucas papillas sesseis pré e post anaes; espiculos desiguaes na forma e dimensões; gubernaculo ausente. *Femea:* cauda arredondada; *vulva proxima do anus;* ovejector curto dirigido anteriormente, bifurcando-se em dois ramos uterinos; ovos de casca grossa, embryonados no utero.

Parasitas da superficie dos olhos e sob a membrana nictitante de passaros.

Especie typo: *Hempelia hempeli* n. sp.

Hempelia hempeli n. sp.

Figuras 1-5

Macho: comprimento 9,9 — 11 mm.; largura 0,28 — 0,33 mm.
Femea: » 16 — 18 mm.; » 0,4 — 0,45 mm.

São nematoides de colorido esbranquiçado, afilando-se gradualmente para ambas as extremidades; a anterior é arredondada e a posterior mais afilada; nos machos a extremidade posterior é enrolada ventralmente.

A cuticula é finamente estriada transversalmente; vêm-se tambem estrias longitudinaes, mas parece que não são cuticulares e sim formadas por fibras musculares do corpo, visiveis atravéz da cuticula como MANSON já assignalou para a *Oxyspirura mansoni.*

A bocca é circundada por 6 pares de papillas: 2 lateraes e 4 submedianas; abre-se em um pequenino vestibulo de paredes pouco chitinizadas, medindo 0,02 × 0,02 mm.

O anel nervoso está situado mais ou menos a 0,23 — 0,24 mm. da extremidade anterior e o póro excretor fica mais ou menos a 0,39 mm. da mesma extremidade.

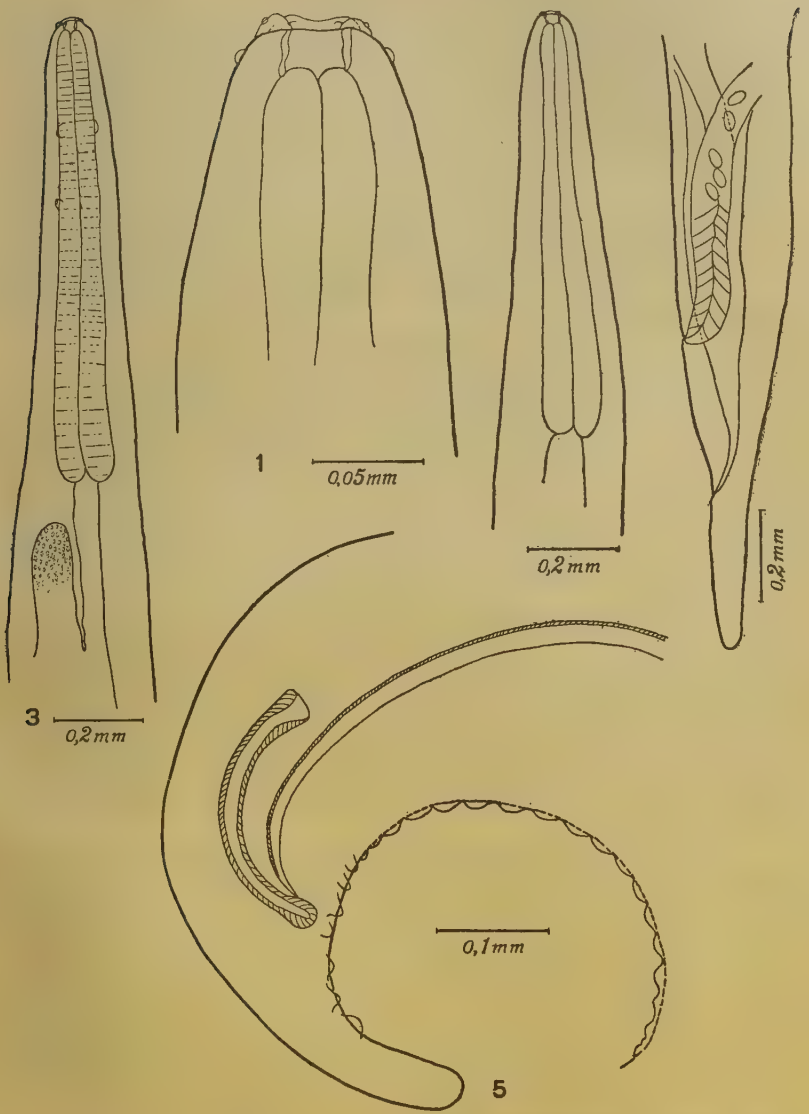
O esophago é indiviso, aproximadamente cylindrico, alargando-se ligeiramente em direcção á extremidade posterior: méde de 0,80 — 0,86 mm. de comprimento por 0,10 — 0,14 mm. de largura maxima nos machos e 1 a 1,05 mm. de comprimento nas femeas.

O intestino póde ser acompanhado com facilidade em toda a sua extensão e é seguido de um curto recto que se vae afilando gradualmente até o anus.

Macho: a alça superior do testiculo vae até proximo da extremidade posterior do esophago.

Os espiculos são desiguaes na forma e dimensões: o maior é filiforme, pouco chitinizado, com extremidade distal ponteaguda, medindo 0,44 — 0,50 mm. de comprimento; o menor é grosso, bem chitinizado, com extremidade distal arredondada e medindo 0,23 — 0,27 mm. de comprimento.

A cloaca está situada a 0,18 mm. da extremidade da cauda. Esta não apresenta azas caudaes e é provida de 7 pares de papillas sesseis das quaes 3 são pré-anaes, uma ad-anal e 3 post-anaes.



Hempelia hempeli n. g. n. sp. Fig. 1 — Extremidade cephalica. Fig. 2 — Extremidade anterior: esophago. Fig. 3 — Extremidade anterior: anel nervoso e póro escretor. Fig. 4 — Extremidade posterior da femea: vulva e anus. Fig. 5 — Extremidade posterior do macho: espiculos e papillas caudaes.

Femea: a vulva abre-se na região posterior, proximo do anus, a 0,7 mm. da extremidade caudal. O ovejector, que tem paredes musculares, dirige-se para a região anterior e méde 0,4 mm. de comprimento; após essa extensão, resolve-se em dois ramos uterinos. Os ovos são providos de casca grossa, embryonados, e medem mais ou menos 0,041 × 0,028 mm. O anus está situado mais ou menos a 0,3 mm. da extremidade posterior.

Hospedadores: *Nothura maculosa* (Temm); nome vulgar: codorna
Rhynchotus rufescens (Temm); nome vulgar: perdiz

Habitat: Superficie dos olhos e sob a membrana nictitante.

Distribuição geographica: Itararé; Estado de S. Paulo. Brasil.

Typo e Cotypos: Colleção Helminthologica do Instituto Biologico de São Paulo.

ABSTRACT

"Hempelia hempeli" n. g. n. sp. *Spirurid worm parasite of the eyes of Tinamiformes birds.*

In a previous paper the author has stated, in redescribing Tetracheilonema quadrilabiatum, that it is unreasonable to consider Filaria tinami variegati as synonymous of that species. Filaria tinami variegati is a name given by Molin 1858 *to a worm, based on a single female specimen in a bad state of preservation, which seemed to belong to Filaria labiotruncata. The material was collected by* Natterer *from the eye of Crypturus variegatus (Tinamus variegati) a Tinamiforme bird of the Amazon region. No description of the species was made by* Molin. *Posteriorly* Diesing *has studied* Molin's *material and has considered F. tinami as syn. of Tetracheilonema quadrilabiatum. In view of the absence of description or figure by* Molin *the author was led to the conclusion that Filaria tinami variegati must be considered as «nomen nudum».*

Through the kindness of Dr. A. Hempel *the writer had the opportunity of examining good preserved material of a nematode worm from the eye of Nothura maculosa and Rhynchotus rufescens and verifies that it belongs to the Thelaziidae and that it cannot be included in the already known genera of this family. A new genus Hempelia is proposed, occupying an intermediate position between Thelazia and Oxyspirura; in Hempelia the vestibule is identical to that observed in Thelazia but differs from it in the position of the vulva, that is located near the anus; the structure of the mouth capsule distinguishes easily Hempelia from Oxyspirura. The material from N. maculosa and R. rufescens cannot be considered as Filaria tinami variegati in view of differences in geographic distribution and hosts and is described as a new species.*

Hempelia n. g.

Thelazidae: Mouth without apparent lips followed by a very short vestibule (as in Thelazia) with thin chitinized walls; two pairs of lateral and four pairs of submedian head papillae; cephalic cuticular dilatations present; oesophagus cylindrical, not divided into two parts. Male: tail blunt and in-rolled, without caudal alae; a small number of pre and post anal sessile papillae present; spicules unequal in size and shape; gubernaculum absent. Female: Tail bluntly rounded; vulva near the anus; the short ovijector is directed anteriorly and divided into two uterine branches; the thick-shelled eggs contain a larva at deposition. Parasites under the nictitating membrane and on the surface of the eyes of birds.

Type species: Hempelia hempeli n. sp.

AS EPIZOOTIAS DE RAIVA NA AMERICA E O PAPEL DOS MORCEGOS HEMATÓPHAGOS

POR

V. Carneiro

Trabalho do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 1 figura no texto

I — Interesse actual do problema da raiva em pathologia animal.

II — As epizootias entre os carnivoros domesticos e selvagens e entre os herbivoros. Papel do cão.

III — As epizootias de raiva no Brasil. Os primeiros fócos do littoral sul: Sta. Catharina, Rio Grande do Sul, Paraná. Os fócos de Matto Grosso e do Espirito Santo. Dous fócos em S. Paulo. As vaccinações.

IV — As duvidas, confusões e contestações ao diagnostico: doença de Aujeszky; os casos occorridos com as epizootias do Brasil; o caso da Argelia, o da ilha de Trinidad, o da Russia. Diagnostico differencial da raiva.

V — As epizootias de Trinidad e os casos de raiva humana. Os fócos do Paraguay, da Argentina e da Guyana ingleza.

VI — A transmissão da raiva pelos morcegos hematóphagos. Estudo do morcego. Luta contra a raiva e contra o transmissor.

* * *

No littoral do Estado de Sta. Catharina, em frente á ilha em que se localisa a cidade de Florianopolis, ha um logarejo denominado Serraria, collocado entre os municipios de S. José e Biguassú. Era um povoado pobre, como toda aquella região, de vida rural primitiva e estacionaria. Alli, nas pastagens de Serraria, ha quasi tres decennios, surgiram os primeiros rumores em torno de uma doença desconhecida, alarmando os colonos da região.

Outros fócos foram surgindo em seguida, mais graves e mais extensos, destruindo ás vezes em um anno, cerca de duas mil cabeças de animaes, privando os colonos do seu meio de locomoção habitual e compromettendo o transporte de farinha de mandioca que, quasi só, constituia o movimento commercial de toda a zona flagellada.

No mesmo local, no mesmo Estado a principio, e depois em outras regiões do Paiz, no littoral, no sertão, ao norte, ao sul do primeiro fóco conhecido, outros foram surgindo, e á medida que iam sendo

conhecidos, tornava-se mais clara a impressão da gravidade e da extensão do flagello. Viu-se, mais, que este se estendia ao longe, a outras regiões do Continente, o que consolidava a impressão da importancia do problema. Elle vem sendo, desse modo, incessantemente investigado.

O valor reduzido dos effectivos dizimados, as enormes distancias difficultando o trabalho do laboratorio, o descaso das populações locaes, sem confiança na intervenção technica, — explicam a lentidão relativa com que esses fócos, numerosos e dispersos, se tornaram bem conhecidos e com que o problema da raiva no Brasil e em outras regiões da America se mostrou afinal em toda sua gravidade.

Uma analyse retrospectiva, percorrendo a litteratura dispersa, nos permittirá focalisar certos aspectos proprios da doença, mostrar-lhe a extensão impressionante e a gravidade, a epidemiologia estranha e imprevista e ver os factos essenciaes, esclarecidos pelas investigações destes ultimos annos.

Dous fócos novos de raiva paralytica dos herbivoros, verificados recentemente, no littoral e no interior do Estado, em Ubatuba e em Itú, nos forneceram opportunidade para um novo encontro com a doença. Pareceu-nos desse modo que seria util reunir o que se conhece sobre o assumpto, em 26 annos de epizootias periodicas.

Examinaremos mais longamente um ponto que nos parece interessante de ser recordado e analysado de perto, depois que todas as duvidas se dissiparam: é a questão do diagnostico e do diagnostico differencial da raiva. Em torno della têm sido frequentes as confusões e a ellas fizemos referencias quando estudamos a doença de Aujeszky (14). A litteratura é rica de exemplos demonstrativos das difficuldades que ahi se encontram. O caso brasileiro foi, a esse respeito, longamente discutido e o exame actual dos factos permitte constatar que elle havia sido visto de modo acertado e conduzido dentro da realidade desde o inicio, o que nem sempre se constata em outros fócos da mesma affecção.

Uma questão que deverá ser igualmente examinada é a da transmissão da raiva pelos morcegos hematóphagos, retomada pela experimentação conduzida no Brasil e acompanhada da verificação surprehendente, na ilha de Trinidad, de casos de raiva humana transmittida pela picada desses animaes. Esses factos, colhidos ha poucos annos, foram estudados pelos pesquisadores americanos.

Interesse actual do assumpto

Não caberia nos limites deste trabalho uma revista da litteratura da raiva entre os animaes domesticos. Qualquer revisão nesse sen-

tido, mesmo em largos traços, colhendo apenas os grandes factos essenciaes, — exigiria maior extensão. O problema tem sido tratado em obras de especialistas, como BABES, MARIE, KRAUS e SCHWEINBURG; mais recentemente, em relação á raiva animal na Africa, no bem documentado capitulo do livro de CURASSON.

O problema examinado como se mostra na Europa, parece nada apresentar que justifique uma revista do assumpto. Ali, de facto, a raiva pertence ao grupo das velhas doenças que faziam outrora accidentes frequentes e graves, que o tratamento pastoriano e as leis sanitarias contra o cão fizeram rarear cada vez mais. Ella pertence mesmo ao grupo das doenças em via de desapparecimento, conforme os dados reunidos pelo Officio Internacional de Epizootias e relatados por LECLAINCHE (31); ha hoje numerosos paizes totalmente indemnes de raiva.

Quando se estuda o problema na America elle se mostra sob outros aspectos, que vamos examinar. Elles apresentam especial interesse para o estudo dos virus neurotropicos entre nós e para orientação dos trabalhos do Instituto sobre o assumpto.

Deve-se lembrar, de passagem, que a lista dos virus neurotropicos vem crescendo e não está certamente fechada. A descoberta de virus novos e o estudo mais completo de outros, mais conhecidos, vieram mostrar a necessidade de examinar de novo o diagnostico differencial.

A litteratura tem outros exemplos demonstrativos da incessante actualidade do problema. Até ha poucos annos se acreditava, por exemplo, que o *ouloufato*, raiva canina do norte africano, não era transmissivel ao homem. NICOLAU e collaboradores (38) mostraram o infundado dessa supposição. A raiva de laboratorio é objecto de um estudo interessante de REMLINGER (51), em 1935. No que concerne á pathologia animal, ás vaccinações, á applicação de leis sanitarias, aspectos novos se contam e lacunas mesmo se encontram a preencher. Assim o problema das vaccinações do cão e dos herbivoros, seja a vaccinação de precaução, seja depois de mordedura, são assumptos por toda parte estudados. Elles dão margem, em relação ao cão, a pontos de vista diversos e mesmo irreductiveis, explicaveis pelas differenças de situação proprias aos centros onde devem actuar as leis sanitarias. Essas vaccinações entram cada vez mais na pratica corrente.

II — AS EPIZOOTIAS ENTRE CARNIVOROS DOMESTICOS E SELVAGENS E ENTRE HERBIVOROS

Devemos começar pelo estudo das epizootias entre os grandes animaes na America, examinando em primeiro lugar a litteratura brasileira. Ella é a primeira em ordem chronologica e certamente em importancia. Veremos depois os fócos em outros paizes sul-americanos e, por ultimo, as epizootias estudadas na ilha de Trinidad.

Antes de examinar as epizootias occorridas na America, parece conveniente referir, embora rapidamente, as velhas epizootias conhecidas na Europa. Isso permittirá um confronto e mostrará o contraste.

Se a raiva é propria de todos os mammiferos domesticos e selvagens, alguns, mais pelas suas condições de vida do que por uma receptividade especial, são particularmente expostos ao contagio: o cão, o gato, os carnivoros selvagens, de um modo geral, como o lobo, a raposa, a hiena, o chacal, e em seguida os herbivoros, boi, cavallo, carneiro, camello, cabra. Ainda podem ser mencionados o porco, o coelho, os roedores em geral, e muitas outras especies.

E' uma noção classica a de que o lobo, a raposa, o chacal, a hiena constituem, nas florestas impenetraveis da Europa oriental, da Asia e da Africa septentrional ou austral, reservatorios do virus rabico e meios muito favoraveis á sua conservação permanente e á sua propagação. BARBIER (5) assignalava-o, estudando uma epizootia na raposa.

As estatisticas de todos os paizes, relativas á incidencia da infecção, assignalam, como se sabe, uma alta frequencia no cão. Em seguida, no boi, no carneiro, no cavallo, no gato, no porco, na cabra. Alguns exemplos o demonstram.

Na Allemanha (20), em annos em que maior foi o numero de casos, os seguintes dados são demonstrativos:

	1896	1898
N.º de casos em bovinos	190	223
N.º de casos em caninos	724	904

No periodo de 32 annos, de 1896 a 1918, houve na Allemanha um total de 23.750 casos de raiva entre os animaes, sendo 18.781 no cão e 3.693 no boi. O numero restante de casos se reparte entre as outras especies, na seguinte ordem decrescente: porco, carneiro, cavallo, gato e cabra.

Na Russia (40), em estatisticas antigas, o numero de casos em bovinos é bem maior, mas ainda assim o cão apparece bem representado: de 1890 a 1898, os dados reunidos sommam alli 6.569 casos no cão, 7.268 nos bovinos e 1.382 casos no cavallo.

Percorrendo estatisticas recentes, relativas ao anno de 1935, esses dados continuam concordando. Assim, na Tchecoslovaquia (76) e na Yugoslavia (77); no primeiro paiz houve 287 casos de raiva, sendo 251 no cão e 36 nas outras especies; no segundo, houve 840 casos, sendo 629 no cão e 211 nas outras especies.

As pequenas epizootias entre *carnivoros domesticos e selvagens* são velhas como o conhecimento popular da infecção. PASTEUR mes-

mo, no começo do seculo XIX, viu surpreso, no Arbois, uma luta entre lobos e cães e foi esse o primeiro contacto do seu espirito com o problema que, meio seculo mais tarde, devia abordar e resolver de modo genial.

O grande e velho fóco das epizootias, na Europa, é a Russia. E' do meio rural, das montanhas e das mattas, que desce o contagio ás especies domesticas, no seu contacto accidental com as especies selvagens. Em toda a Europa epizootias graves eram conhecidas e uma dellas, que teve inicio no começo do seculo XIX, fez estragos durante meio seculo. Na America do Norte do mesmo modo, epizootias do lobo e da raposa eram com frequencia assignaladas.

Barbier (5) estudava na França, em 1926, uma epizootia que grassava no departamento de Côte d'Or, durante longos mezes: 22 casos de raiva da raposa foram bem verificados; numerosos casos teriam passado ignorados, perdidos nas mattas. Cadaveres de raposas haviam sido encontrados pelos guardas, caídos nas estradas, em numero surpreendente. Cinco kilos de sulfato de estrichnina deram cincoenta mil bolas de Ogr.1 que foram espalhadas na região. No espaço de dois mezes foram encontrados 119 cadaveres de raposas.

Na Africa do Sul, Du Toit encontra como transmissores frequentes, certas especies de felideos, já vistos aliás, desde 1916, por Cluver (25).

* * *

As epizootias entre *herbivoros selvagens,* o cabrito montez dos Alpes, o veado, e entre os herbivoros em captividade, como o gamo, são mais raras. Na Inglaterra, em épocas diversas, os gamos dos parques reaes foram dizimados. Vivendo em rebanho, em captividade, elles têm, com relativa frequencia, a forma furiosa, e as epizootias assumem por isso mesmo um aspecto grave entre elles, operando-se a propagação pelos ataques frequentes e pelas brigas. Em 1795 e 1798 foram flagellados os parques de Grove e de Windsor; em 1872 e 1880 os de Eaton Hall e de Swythamby. Em 1886-87, um surto grave irrompia no parque de Richmond, e 264 gamos eram dizimados (40).

Esses dois aspectos relativos á incidencia da infecção, — frequencia da raiva canina e raridade de epizootias graves entre os herbivoros domesticos, — servem para mostrar que a litteratura não conhecia relato algum de factos identicos aos que occorrem desde longos annos, com frequencia e grande mortalidade, em differentes regiões do Brasil. Os dados estatisticos que teremos de examinar mostrarão o vulto dos prejuizos.

Esse aspecto alarmante de incidencia da raiva tem outro lado interessante: é estranho e excepcional, e assim pareceu aos pesquisadores europeos, justamente porque, quando as epizootias occorriam na Europa, o cão explicava o seu apparecimento, ou os carnivoros selvagens podiam ser responsabilizados, ou ainda o cão era o responsavel por um primeiro surto, e a propagação posterior podia ser attribuida á occorrencia de aggressões, realizadas pelos animaes atacados da forma furiosa. No Brasil a affecção se mostrava sob a forma de uma paralysia ascendente e, na maioria dos casos, a aggressividade dos animaes atacados podia ser excluida; o cão ou os animaes selvagens, os classicos transmissores, não pareciam explicar convenientemente os factos, ou não eram incriminados pela maioria dos observadores.

Dahi as duvidas e contestações de diagnostico apparecidas no estrangeiro e feitas sem um conhecimento mais preciso das condições proprias do nosso meio. E' um ponto interessante, que estudaremos mais longe.

III — AS EPIZOOTIAS NO BRASIL

O primeiro fóco em Santa Catharina

A litteratura nacional relativa a essas epizootias inicia-se com o relatorio de Constantino Stroppa (62), em 1911. Elle estuda, pela primeira vez, o fóco occorrido no littoral de Santa Catharina.

A região situada entre a serra e o mar é a mesma em que vamos vêr, mais tarde, a eclosão de novos fócos. Um inquerito preliminar constata que o primeiro surto tivera inicio havia pouco mais de tres annos, em 1908, no morro da Felisbina, municipio de Biguassú, de onde se estende até o mar uma planice baixa e humida. São atacados os bovinos, equinos, suinos, ovinos e caprinos. Em 1908 morrem 152 bovinos. Em 1909 a epizootia se estende para o norte, até a villa de Biguassú, a cinco kilometros do morro, matando 805 bovinos, 40 suinos e caprinos. Em 1910 a infecção toma grandes proporções, estende-se de Biguassú para o norte, para o sul, para o interior, alcançando nessas direcções numerosos logarejos: Alto Biguassú, Tres Riachos, Fazenda, Sorocaba, Inferninho, Tijuquinha, Cahéra, Armação, Ganchos, São Miguel, Ruchadel, São José, Palhoça, Aririu, Santo Amaro. A enumeração desses lugares dá uma ideia da extensão do mal, e a mortalidade é de 1.600 bovinos, 75 equinos, 30 suinos e alguns caprinos. Embóra se possa admittir que certo numero de obitos corra por conta de outras causas, é innegavel que os prejuizos eram alarmantes, em uma região pobre, de vida rural primitiva e estacionaria, povoada de colonos e de reduzidos effectivos.

Stroppa analysa em longas paginas os diversos aspectos da affecção que lhe pareceram dignos de realce. Em relação á symptomatologia, assignala:

Os animaes mantêm-se tristes, cabeça baixa, olhos semi-cerrados, indifferentes a tudo que os cerca, deitando-se levados por uma fraqueza extrema. Ha inappetencia e suppressão da ruminação. Em alguns casos assignalam-se: rangidos de dentes, movimentos desordenados da

Fig. 1 — *Brasil* — Regiões em que fócos de raiva paralytica dos animaes domesticos têm sido identificados, a partir de 1911.

cabeça, olhos salientes, baba espumante e viscosa, tremores musculares, até a morte «precedida de batimentos e convulsões de um animal raivoso». Em outros doentes há «hyperesthesia cutanea, ás vezes horrorosa, esfregando-se as rezes até sangrar, de encontro a corpos duros e contundentes e mordendo-se até arrancar as carnes». A duração é de tres a cinco dias.

As descripções são extensas, de modo que não seria possivel resumil-as. Longas citações da litteratura veterinaria enchem paginas.

Infelizmente, depois de um quadro clinico apresentado com luxo de detalhes, falando em baba, rangido de dentes, opisthotono, hemiplegias, paraplegias, paralysias, ataxias, olhos fixos e exorbitantes, convulsões, — depois de allusões claras a uma doença de symptomatologia nervosa, STROPPA entra, lamentavelmente, por uma trilha falsa e conclúe que se trata de peste bovina.

Como trabalho de documentação, o relatorio não é destituído de todo o merito; contém dados precisos sobre a symptomatologia e sobre o vulto dos prejuizos verificados. E' curioso assignalar, pelo que ahi se vê, que STROPPA teve deante de si, viu e descreveu de modo a não deixar duvidas, casos authenticos de raiva. Entre as muitas caracteristicas que falavam contra a peste bovina está o facto da doença attingir o cavallo. O autor preferia vêr ahi motivo para assignalar um facto novo.

* * *

O caso assumia aspecto de um verdadeiro flagello, ameaçando destruir todo o rebanho da região. O alarme impressiona as autoridades locaes, atravessa os corredores, preoccupando o governo do Estado e o governo central. O diagnostico apressado de peste bovina, affecção isolada hoje á Asia e á Africa, sendo toda a America indemne, — trazia comsigo uma nova onda de apprehensões alarmantes.

O diagnostico preciso é firmado em 1911, por CARINI (11). O diagnostico de CARINI, que tem o merito da primeira identificação das epizootias na America, é baseado nos signaes clinicos, em inoculações e verificações histologicas. A hypothese de peste é logo afastada, por duas razões de força: ausencia das lesões caracteristicas e sensibilidade do cavallo á infecção natural.

Os prejuizos são avaliados em 4.000 bovinos e 1.000 equinos. A epizootia tem pouca tendencia a propagar-se e fica localizada em um raio de 20 kilometros, entre a serra e o mar. A população daquelles logarejos vê-se privada de animaes destinados aos trabalhos de cultura e transporte.

As duas formas clinicas são assignaladas, predominando a forma paralytica, com perturbações da marcha; duração de 2 a 3 dias. Na forma furiosa há aggressividade. O prurido cutaneo é assignalado em alguns casos. As autopsias são inexpressivas, do ponto de vista de lesões grosseiras, mas o exame histologico revela corpusculos de Negri e as inoculações permittem resultados definitivos em favor da raiva.

A affecção é igualmente alli estudada por Parreiras Horta (42-43), que faz um longo estudo clinico, permanece no proprio local, assignala que a mortalidade é de 2.000 animaes, apenas para o municipio de Biguassú e constata que os campos appareciam coalhados de ossadas de animaes. Os primeiros casos são vistos em Serraria, a cerca de 20 kilometros de Biguassú. Photographias mostram alguns casos em que se podem vêr aquellas primeiras perturbações das attitudes e da marcha, dando o quadro de uma ataxia locomotora, tão caracteristica no cavallo.

A forma paralytica comprehende a grande maioria dos casos; a duração é de 5-6 dias, mais raramente de 10-12. Os symptomas podem ser resumidos em inquietação, a principio, perturbações da ruminação e da marcha; signaes de paresia se sobrepõem, seguidos de paralysia franca dos membros anteriores ou posteriores. Há indicios de fadiga, dyspnéa, polypnéa, baba, narinas dilatadas, contracções fibrilares de certos musculos, curvatura do pescoço sobre o thorax, rangidos de dentes, paralysia intestinal, contracções violentas dos membros.

Há, no caso de uma vacca, intenso prurido cutaneo, e o animal se esfrega de encontro á arvore a que está preso (caso n.º 12). O prurido lembra a doença de Aujeszky e o autor não se esquece de dizel-o. O exame actual desse caso permitte vêr que o diagnostico de raiva estava certo, embora material desse animal não tivesse sido estudado. A peste de coçar pode ser afastada pela duração do curso clinico; e esse caso evoluiu em quatro dias. Essa indicação é importante, porque vamos vêr mais adeante outros casos de raiva com prurido cutaneo.

Parreiras Horta estuda o virus em bovinos, equinos, caninos, coelho, cobaia e macaco. No boi, por via subdural, observa, ao cabo de 12 dias, as primeiras perturbações da marcha, seguidas de baba, movimentos convulsivos, etc., e morte em cinco dias. Em outro caso há aggressividade. No cavallo, ainda por via subdural, o periodo de incubação é de 8-10 dias. A evolução se faz em 4-6 dias. No cão, em tres inoculações, apenas um caso positivo, depois de 20 dias de incubação; passagens não são feitas, mas corpusculos de Negri são encontrados. No coelho as inoculações nem sempre são positivas, mas com o virus de 9 de Março consegue o autor, ao cabo de 13-14-16-17 dias, a evolução da raiva paralytica. Um serviço de vaccinação por via venosa é organisado e, ao mesmo tempo, um serviço de vaccinação humana, pelo methodo classico.

* * *

Os annos iam passando e a epizootia installada em uma zona de criação rudimentar e de effectivos reduzidos, não podia realizar estragos maiores do que realizou. Passado o periodo agudo, os prejuizos devem ter persistido com as caracteristicas de um mal chronico, talvez tido como irremediavel e afinal supportavel. As medidas tomadas devem ter reduzido a mortalidade, ao menos temporariamente.

Santa Catharina possue porém, toda uma região florescente, povoada e trabalhada por colonos allemães, e essa foi igualmente visitada pela doença.

O seu estudo é retomado por HAUPT e REHAAG (21, 22, 23, 24), em 1914-16, no novo fóco. Os primeiros casos occorreram desde 1909, no municipio de Blumenau, cidade importante da zona.

A observação desses autores se prolonga. O primeiro permanece no fóco, de maio a agosto de 1914 e o segundo, de fevereiro de 1916 a abril de 1917, em caracter official, e mesmo até 1919, em caracter particular.

As observações clinicas confirmam os dados anteriores. Casos occorrem no boi, no cavallo e no burro. Em um vitello, há prurido cutaneo violento, localizado na cabeça, ao nivel da inserção dos chifres. A evolução se faz em sete dias, o que nos permitte, ainda, afastar a possibilidade de um caso de peste de coçar (caso n.º 4). O caso n.º 8 é igualmente acompanhado de prurido; a evolução é mais rapida, mas se faz em $2^1/_2$-3 dias. Os autores encontram, além disso, corpusculos de Negri em material nervoso desse animal. Um terceiro caso, novilha n.º 14, revela ainda a coceira intensa ao nivel do pescoço; a evolução se processa em quatro dias pelo menos, o que afasta ainda, a possibilidade de occurrencia da doença de Aujeszky num fóco de raiva.

Parece, pois, muito pouco provavel, á luz dos dados de que dispomos actualmente, que se possa admittir ter havido coexistencia das duas affecções naquelles fócos. E' o que se depreende da revisão que fizemos dos dados que a litteratura contém.

Em 1913, a epizootia se propaga, e surgem casos em Blumenau e Joinville, os dois municipios mais importantes da zona; em 1914, em Paraty e na ilha de São Francisco.

De 1908 a 1914 tinha sido verificado a occurrencia da doença em uma área de 170 kilometros de extensão e 60 kilometros de largura. Os casos são vistos apenas na região baixa. Blumenau está localizada no valle do rio Itajahy, que corta a cidade, e pode-se constatar que acima da serra do mar, que corre a uma distancia média de 100 kilometros do littoral e tem uma altitude média de 500 metros, os casos de raiva não occorrem.

Os autores procuram situar e limitar o local em que esses fócos se verificam. O papel das mattas lhes parece innegavel, sem que lhes seja possivel esclarecel-o de inicio. E' uma observação bem feita e que devia dar direcção. Occupam-se igualmente da questão dos morcegos, como veremos mais longe.

Ainda em Santa Catharina, na ilha em que está localizada Florianopolis, a doença se verifica mais tarde e é estudada em 1924, por Alves de Souza (1). Varias versões correm sobre a causa do mal e, entre as mais propaladas, a transmissão pelos morcegos, ou a intoxicação pela mandioca. A notificação diaria é de 5-6 casos. A pesquisa de acido cyanidrico é negativa e a presença de glycosuria orienta o diagnostico. Corpusculos de Negri são encontrados e inoculações ao coelho, com um periodo de incubação de 24 dias, decidem o diagnostico. A glycosuria parece signal de valor, a partir do quarto dia de doença.

O fóco do Rio Grande do Sul

No Rio Grande do Sul, no littoral, a doença é vista nos municipios de Gravatahy, Taquara, São Leopoldo, Conceição do Arroio, em 1924, ainda por Alves de Souza (2, 3). Os seguintes dados resumem o trabalho:

Há seguramente um lustro que a affecção é ahi verificada. Um primeiro diagnostico, em consequencia de ter sido isolada uma pasteurella do sangue de bovino, concluia pela septicemia hemorrhagica. Alves de Souza se mostra surpreso, considera o germen isolado sem significação no caso, vê que se passa alli o mesmo que lhe tinha sido dado vêr em Florianopolis. A symptomatologia, a glycosuria, a presença de corpusculos de Negri falam pela raiva e, do mesmo modo, as lesões dos ganglios plexiformes, as inoculações em coelhos e em bovinos, com um periodo de incubação de vinte dias nesta especie.

O movimento de bois de carro na zona rural é muito intenso, e numerosos desses animaes são victimados. Cães hydrophobos são encontrados em São Leopoldo.

A raiva no Estado do Paraná

Em 1926, estudamos uma pequena epizootia grassando no littoral do Estado do Paraná (13, 19). O material que serve aos nossos exames, feitos com Freitas Lima e a principio com Castilho, é colhido de casos occorridos em muares de uma serraria proxima á estação de Porto de Cima, na raiz da serra da Graciosa, a pequena distancia da cidade de Morretes. Os animaes atacados são vistos apresentando paralysia da região posterior ou anterior, acompanhada de paralysia intestinal e vesical, contracções fibrilares ao nivel dos mus-

culos do pescoço, fadiga, etc. Um inquerito feito na região permitte vêr que em quatro mezes, em uma região de raros effectivos, morrem cerca de 40 animaes, entre bovinos, equinos, muares e suinos. O dono de uma pequena venda, na encruzilhada da estrada de rodagem de Antonina, com a de Morretes, perde os sete unicos cavallos que possue. Mais adiante vamos vêr 10 casos em bovinos, em uma fazenda de 150 animaes, onde nos falam de casos de raiva furiosa. Um proprietario de Morretes, com 100 animaes entre bois e cavallos, perde, em um anno, 32 cabeças.

E' curioso assignalar que os fócos de raiva no littoral sul do Brasil têm todos a mesma topographia: surgem na baixada que percorre a costa, entre o mar e a serra, em uma região do mesmo clima e de vegetação identica. O papel das mattas nos parecia innegavel e isso se constata de modo flagrante, quando os casos são vistos em uma serraria encostada á matta, onde os animaes penetram pastando, ou passam a noite, em repouso. Não nos é possivel então um estudo que determine a área de extensão desses casos. Difficuldades de verbas obrigam-nos a limitar nossa actividade á identificação da doença, trabalhando em local cedido pelo Instituto Pasteur de Curityba.

O diagnostico de raiva paralytica não nos parece ahi tão facil, quando se considera a possibilidade da ocurrencia, num mesmo local, de outras affecções não identificadas entre nós, como as encephalomyelites do cavallo. Havia pouco que as encephalo-myelites do cavallo e do boi haviam sido estudadas na França por MARCHAND e MOUSSU (37). Em uma primeira publicação, insistimos na questão do diagnostico differencial (19) e na utilização das provas de immunidade cruzada.

A symptomatologia, as inoculações em serie, o periodo de incubação, a duração do curso clinico, a evolução no coelho, permittem uma conclusão pela raiva.

* * *

No Rio Grande do Sul, a doença é vista de novo por ALVES DE SOUZA (3), em fins de 1926. Nessa época nove municipios, desde Porto Alegre, são attingidos, e só em Belem Novo, districto da Capital, uma turma de trabalhadores enterra 244 carcassas. As perdas são de 1.632 cabeças, sendo 1.175 bovinos, 428 equinos, 16 suinos, 12 ovinos e um cão. Parece, no entanto, que o numero de cães raivosos na Capital é mais elevado, pois em quatro mezes soffrem alli o tratamento antirabico cerca de 400 pessoas. Um serviço de captura de cães é feito e 570 são vaccinados. BASEWITZ (6) nota que o numero

de cães vadios em Porto Alegre e arredores é excessivo e que os casos de raiva canina são muito frequentes.

O primeiro fóco central — Matto Grosso

Depois desses fócos do littoral, um é assignalado no interior do Paiz, em Matto Grosso.

E' estudado por Alves de Souza (4), no municipio de Rosario Oeste, em fins de 1928. Casos haviam sido vistos em Brótas, Forquilha, etc. e em Cachoeirinha, tres annos antes. Em 1907-1908, pessoas do local se recordam de uma epizootia em cães. Foi feita uma grande caçada de cães e grande numero desses animaes foi sacrificado. Conta ainda o relatorio que houve casos de raiva humana em Cuyabá, sendo necessario prender a laço pessoas atacadas em plena cidade. Em 1911-12 houve nova epizootia e em 1920, casos de raiva entre cães e bois. Em 1925 a doença foi constatada em Pranchão, Cachoeirinha, não se sabendo de casos em cães. Em 1926, só um criador perde 20 % do gado. As seguintes localidades são visitadas pela doença: Chiqueiro, Pitas, Grotas, Bauxy, Agulha, São José, Pitanga, Capim Branco, Campina e ainda Engenho, Nobres, Corrego Fundo, Serragem, Cavallo, Baixio, Cancella, Pranchão, Diamantina, até Rio Manso. Houve mesmo casos em vaccas de leite da cidade de Rosario. Em tres annos a epizootia alcança 15 leguas e mata 3.385 bovinos, 182 equinos, 230 porcinos, 26 cães, num total de 3.881 animaes. E' um facto verificado e commentado a mortalidade de veados. Rosario de Oeste é um dos grandes municipios do Estado, limitando-se com Cuyabá, Diamantina, Poconé, S. Luiz de Caceres; tem, mais ou menos, a forma de um cachimbo, e a doença grassa na extremidade.

Suspeitas já existiam desde 1927, de que se tratasse de raiva. Casos são vistos por Franco de Faria (17), que pensa nesse sentido. Existia no entanto, da parte de alguns veterinarios, a suspeita ou mesmo a convicção, de que se tratasse de doença nova. Era essa a opinião de Bruno (9-10).

Do mesmo modo que nos fócos anteriores, a clinica, a glycosuria a presença de corpusculos, as inoculações — coelho, cobaia, cão, cabra, bezerro — falam pela raiva. A virulencia da saliva é constatada na infecção experimental.

A raiva do cão é frequente em Cuyabá e em Rosario a população canina é numerosa. A raiva do veado é frequente e ás vezes evolue sob forma furiosa, com aggressividade. Um criador conta varios casos nestes animaes. Parece ao autor que o veado pode ser um reservatorio de virus.

A epizootia de 1928 se inicia em fevereiro, com 15 casos; a maior incidencia é verificada nos quatro ultimos mezes do anno e em Outubro principalmente, quando se verificam 454 casos. O numero de casos comparado com a população animal da região permitte fornecer os seguintes dados:

	Existentes	Mortos
Bovinos	2.590	377
Caprinos	55	7
Equinos	104	49
Suinos	270	33
Ovinos	—	—
Caninos	45	3

A epizootia de Matto Grosso tem sido, depois disso, novamente examinada.

Assim Queiroz Lima (46), em 1932, observa em relação á área da infecção:

O mappa da zona infectada realizado por inspecção ás regiões flagelladas, mostra que a doença se estendia de Cuyabá a Rosensal, alcançando o Rio Manso ao nascente e a fazenda Coqueiros ao poente, medindo, em linha recta, aproximadamente, 200 kms. de sul a norte e 220 kms. de leste a oeste, abrangendo região accidentada, feita de morrarias e chapadões, coberta de campos cerrados e apresentando apenas nos valles e nas margens dos rios, mattas que se alongam pelas varzeas estreitas, desenhando o curso sinuoso dos rios. A grande zona da infecção abrange, pois, uma área de 26.900 kms.^{2}, quasi igual á do Estado de Alagôas, compreendendo grande parte dos municipios de Diamantina, Rosario Oeste, Cuyabá e Livramento e attingindo o extremo norte do municipio de Poconé e o canto nordeste do municipio de S. Luiz de Cáceres.

Apenas pelo lado do sul há contiguidade entre os campos cerrados da «morraria» e dos chapadões, que são o dominio da epizootia, e os campos criadores, que são mais baixos á medida que se approximam do pantanal. E' nessa direcção que a molestia tem progredido e dahi o receio dos criadores dos campos alagadiços, onde é intensa a criação. Foi verificada outra zona de infecção á margem direita do rio Paraguay e á esquerda do Jaurú, alcançando a «Fazenda Nacional Caiçára».

Nas fazendas, nota-se que o gado que vive nas proximidades das mattas que fraldam as serras e margeiam os rios, é de preferencia attingido. O fóco primitivo e permanente da epizootia está localizado nos campos da serra das Aráras e da serra do Tombador, que constituindo zona de serra, morraria e mattas, é um fóco de morcegos

hematophagos; estes são apontados como um dos maiores estorvos á criação, pelos maleficios que occasionam á criação dos bezerros recemnascidos.

A raiva no Espirito Santo e no Estado do Rio de Janeiro

Ha ainda no littoral do Paiz um fóco importante pela sua extensão e pelos prejuizos verificados, no Espirito-Santo.

A doença existe ahi desde 1912, conforme informações fornecidas por Rossas (59) e adquire em 1915 um caracter grave em uma extensão que vae de Cariacica a Cachoeira de Santa Leopoldina, perto de Victoria. O diagnostico é feito por Pereira (45). Novos casos são vistos por Braga (8) e o fóco é particularmente examinado por Blanc de Freitas (7) que ali *dirige* um serviço de vaccinação. Em 1923 este autor considera o morcego um vehiculo provavel. Verifica que o virus passado por certas especies de morcegos frugivoros não soffre attenuação (Phyllostomides e Emballamuridas).

Os prejuisos, em dois municipios apenas, são avaliados em mais de 400 contos por anno, sendo doze municipios severamente atacados e cinco bem infectados. O numero de casos no municipio de Cariacica é o seguinte (7):

Anno	Casos de raiva por especie			Total
	Bovinos	Equinos	Muares	
1925	653	60	124	837
1926	490	62	43	595
1927	473	36	26	535
1928	142	5	8	155

A quéda da frequencia a partir de 1926 corre por conta, provavelmente, da applicação de medidas sanitarias e, a partir de 1927, é explicada pelo autor pela vaccinação applicada em larga escala, em 1927-28. A erradicação teria sido completa se a vaccinação tivesse sido continuada. A estatistica de vaccinação conduzida por Blanc de Freitas registra os seguintes dados:

Em 1927 . . . . . 2.219 animaes
Em 1928 . . . . . 1.352 animaes
Em 1929 . . . . . 1.691 animaes (até Abril)

A vaccinação é feita pelo emprego de uma unica dose de 20 cc. O periodo negativo da vaccina é de 25 a 30 dias, segundo verificações de Blanc de Freitas (7) e S. Torres (63). Além disso, a im-

munidade resiste, cinco mezes depois da vaccinação, á inoculação, na camara anterior do olho, de Occ.2 de uma emulsão de virus fixo a 10 %. O custo total da dose vaccinante é de $700 a 1$200.

Em 1931, a raiva grassa ainda no Espirito Santo, nos municipios de Santa Leopoldina, Santa Thereza, Santa Cruz, Itaguassú e Serra.

No Estado do Rio de Janeiro, em Monnerat e Campo Bello, têm havido surtos da doença desde 1913.

Dois fócos em São Paulo

Em fins do anno passado, no municipio de Ubatuba, no littoral, houve um pequeno fóco.

Os casos são vistos pelo dr. R. Pace, que remette material ao Instituto, de um bovino autopsiado. As primeiras inoculações são negativas. Novas inoculações em um lote de coelhos e cobaias, por via subdural e por inoculação intramuscular na região cervical, dão resultados positivos, com evolução de paralysias typicas em ambas as especies. Passagens são ainda positivas, dentro de um periodo de incubação de 12-15 dias. Corpusculos de Negri são vistos com facilidade em material de quasi todos os animaes inoculados. O exame histologico é feito pelo dr. J. R. Meyer, a quem o agradecemos.

O fóco de Ubatuba, que nos parece ter sido examinado tambem pelo Instituto de Biologia Animal do Rio, é interessante de ser referido, porque vem fechar a cadeia constituida pelos fócos do littoral sul do Brasil, de Gravatahy, por Biguassú, Blumenau, Porto de Cima, Ubatuba, a Cariacica.

Um segundo fóco occorre no municipio de Itú. Alguns criadores tiveram ali sua attenção voltada para casos mais ou menos numerosos de uma doença fatal, manifestando-se em bovinos e equinos, surgindo sob a forma de uma perturbação locomotora, seguida de paresia e franca paralysia. Foi-nos dado ensejo de surpreender alguns casos, em companhia do dr. M. de Mello, veterinario do Instituto.

Em uma primeira viagem ao local, pudemos vêr em tres pequenas propriedades, em uma extensão de dez kms., tres casos no mesmo dia.

O caracter epizootico, as informações recolhidas e confirmadas na sua fidelidade pela opportunidade de verificarmos tres casos no mesmo dia, traziam já por si uma supposição bem fundada, além das caracteristicas de symptomas, de evolução, de incidencia e de decurso. As primeiras inoculações confirmam facilmente, o diagnostico.

Um primeiro caso occorrera em uma novilha hollandeza, encontrada morta recentemente e que se debatera fortemente, agitando os membros durante horas, apresentando ainda curvatura do pescoço sobre

o thorax. A autopsia nada revela de interessante; a parede externa do myocardo, ao nivel das auriculas, tem o aspecto tigrado. Fragmentos de substancia nervosa são colhidos em Bedson e em Zenker. Inoculações são feitas em cobaias e coelhos. Passagens são positivas e corpusculos de Negri são vistos nas cellulas pyramidaes do corno de Ammon e nas cellulas de Purkinje do cerebello.

Dois outros casos são vistos em cavallos. O primeiro já deitado, em franca paralysia dos membros anteriores e da deglutição, debatendo-se, é sacrificado. As inoculações são ainda positivas, com um periodo de incubação de 10-20 dias e paralysias typicas. O segundo cavallo foi visto em estado de paralysia da região posterior, e impossibilitado de se levantar.

Há indicios de estar em causa o morcego. O ultimo desses tres casos principalmente, segundo informes, era presa habitual de morcegos e os animaes da região vivem soltos á noite em mattas onde existem, com frequencia, morcegos hematophagos.

Por outro lado, o cão não pode ser excluido e parece ser o responsavel pelo inicio dos fócos, pelo menos. Foram varias e accordes as informações fornecidas pelos colonos, relatando casos de raiva furiosa do cão e casos acompanhados de paralysia do maxillar inferior, que não deixam duvida. O cão parece ser o introductor e o primeiro propagador do virus nessas regiões e nesses novos fócos. Pelo menos o fóco de Itú suggere essa reflexão e esperamos que se nos offereça opportunidade para examinar esse ponto.

O numero de casos occorridos foi mais ou menos elevado, cerca de 60, e só um proprietario de sitio perdeu cerca de 15 cabeças, entre bovinos, equinos e muares. Iniciamos ahi um serviço de vaccinação; a fazenda do sr. Quirino de Arruda serviu de centro de nossa actividade. Em dois mezes, cerca de mil vaccinações puderam ser realizadas, usando-se a vaccina phenicada preparada no Instituto, á dose de 25 cc. Sob indicações nossas, o proprietario acima referido praticou, depois, numerosas dessas inoculações.

A intervenção sanitaria tem que agir nesses casos, fazendo intervir a medida mais acceitavel pelo criador. Aqui no caso, certos proprietarios de pequenos effectivos, sem installações mais adequadas, em vez de acreditarem na efficacia do isolamento dos animaes, em curraes ao abrigo de qualquer transmissor, coisa aliás impraticavel em local de criação primitiva, acceitavam de preferencia e promptamente a vaccinação, que pôde ser feita facilmente. Os resultados parecem satisfactorios. Alguns casos nos foram referidos, durante o periodo negativo da vaccinação. Depois disso, no entanto, nenhum

caso veiu ao nosso conhecimento, sendo os interessados mantidos em contacto frequente com o Instituto.

* * *

Resumindo, portanto, todo esse longo estudo da distribuição geographica da raiva no Brasil, pode-se concluir que ella está seriamente disseminada: Santa Catharina, Rio Grande do Sul, Matto Grosso, Espirito Santo, Paraná, Estado do Rio, São Paulo, ás vezes com mais de um fóco em cada Estado; ás vezes, ainda, a disseminação do virus se processando por uma região extensa, — sete Estados pagam pesado tributo á doença, com alternativas de recrudescencia do mal. Pode-se avançar que outros Estados devem ser flagellados, sem que a noticia dos prejuizos chegue ao conhecimento dos technicos, pelas deficiencias de communicações, pelas difficuldades de assistencia, pela descrença impregnada de fatalismo, propria de populações incultas de certos meios ruraes, ou pelo valor reduzido das criações. Estas, ás vezes, se approximam mais do regimen de vida selvagem, que do estado de domesticação, no systema de criação extensiva que ainda predomina em alguns centros pastoris do interior. Além disso, a doença passa muitas vezes ignorada ou rotulada de nomes vulgares, sem que um exame summario possa fazer suppor sua existencia.

Ao encontro desses conceitos, fala a notificação de outros fócos, em estudo pelos nossos collegas do serviço federal, em Minas Geraes, no Rio Grande do Sul. Mesmo em São Paulo, onde os serviços são mais faceis, é lenta a movimentação dos interessados, no sentido de notificar os fócos.

As vaccinações

O governo federal, por intermedio dos seus serviços veterinarios, tem realizado, em épocas diversas, trabalhos de lucta sanitaria, que não se poderiam considerar perfeitos nem completos, pelas difficuldades naturaes e invenciveis que cercam a actividade technica no meio rural. Houve, no entanto, esfórços isolados louvaveis e mais ou menos efficientes, ou pelo exterminio dos cães, no inicio, ou pelas vaccinações. E' lamentavel, no entanto, que um serviço centralizado e permanente, de estudo especializado e de erradicação, não tivesse sido organizado, porque resultariam dahi dados do maior interesse.

Em relação á lucta contra os cães, um trabalho nesse sentido, só em Santa Catharina, extermina, pelas bolas de estrichinina, 12.723 cães.

No que concerne ás vaccinações, um trabalho intenso tem sido realizado e uma experiencia util, alcançada. Pode-se dizer, além disso,

que em nenhuma outra região do globo a vaccinação dos grandes animaes tem sido feita em tão larga escala. Os fócos mais visados pelas vaccinações têm sido o Espirito Santo, Matto Grosso e Santa Catharina.

O resultado dessas vaccinações, no juizo dos technicos que dellas se têm occupado, é francamente satisfactorio, e dados importantes a esse respeito foram colhidos, principalmente no Espirito Santo e em Matto Grosso. Os seguintes dados resumem as estatisticas dessas vaccinações em diversos Estados (7, 46, 18):

Em 1927	Espirito Santo	Blanc de Freitas	2.229 animaes
1928	» »	» » »	1.352 »
1929	» »	» » »	1.691 » (em 3 mezes)
1931	Matto Grosso	Queiroz Lima	59.096 animaes
1932	» »	» »	53.691 »
1932	Santa Catharina	Freitas Lima	15.012 animaes

A vaccinação tem sido realizada com vaccinas preparadas segundo a technica das vaccinas phenicadas e em uma só inoculação de 20 cc. A preparação dessas vaccinas, as modificações de technica de preparo, a efficacia vaccinante têm sido objecto de cuidados de Torres (63-64). A efficacia da vaccinação parece fóra de duvida, nas regiões em que tem sido possivel controlar e acompanhar o decrescimo da mortalidade. Blanc de Freitas assignala que em 1925 a incidencia normal da raiva em Cariacica attingia em média 16,3 %, em um effectivo de 5.107 animaes, pertencentes ás fazendas sob controle. Sob influencia da vaccinação essa incidencia desce a 3.05 %, não tendo sido continuada a intervenção.

Queiroz Lima (46) em Matto Grosso, considera igualmente que as vaccinações constituem um processo efficaz de lucta.

VI — AS CONTESTAÇÕES DE DIAGNOSTICO, AS DUVIDAS E CONFUSÕES. DIAGNOSTICO DIFFERENCIAL DA RAIVA.

As epizootias de raiva entre os animaes domesticos, no Brasil e em outras regiões do continente, tinham, particularmente no Brasil, onde dados mais precisos estão ao nosso alcance, duas caracteristicas essenciaes, que as afastavam, sob certos aspectos, do que se conhecia na longa litteratura que o problema possue: — são ellas, como vimos, o indice elevado de frequencia em certas zonas ruraes,

destruindo-se effectivos inteiros, em regiões pobres, e a ausencia do cão como capaz, por si só, de explicar o desenvolvimento desses fócos graves e extensos, em diversas regiões do Paiz. Uma terceira caracteristica talvez possa ser aqui incluida: a grande predominancia da forma paralytica, aliás igualmente notada por REMLINGER nos cães de Constantinopla e em outras regiões do sul da Europa (41).

Parecia, por isso mesmo, surprehendente e estranho, ao primeiro contacto com o problema, que o diagnostico simples de raiva pudesse explicar toda a grande mortalidade e tudo o que se passava nesses fócos, quando na Europa, onde a doença era tão conhecida e estudada, esse aspecto particular parecia inacceitavel.

A imaginação trabalha nessas occasiões. Suspeitas surgiram, e era natural. Duvidas mais serias se installaram em certos espiritos, tomaram corpo e adquiriram proporções. Contestações vieram em seguida e confusões se succederam, sendo outras doenças, sem razão, incriminadas, como vamos ver.

Tudo isso passou afinal.

Está hoje perfeitamente acceito que é a raiva, com todas suas caracteristicas clinicas, de inoculação, de provas biologicas e histologicas, a affecção em causa, no Brasil e em outras regiões da America. As contestações foram desfeitas pela acção do tempo, pelo trabalho continuado entre nós e pela convicção que adquiriram do seu engano os principaes contestantes, entre os quaes REMLINGER e KRAUS, autoridades no assumpto.

Parece-nos, no entanto, oppotuno recordar e examinar á luz dos dados actuaes, essas contestações, essas duvidas e essas confusões. O seu exame se nos afigura necessario e instructivo, numa revista da litteratura da raiva. Necessario, porque vale a pena reunir e tornar bem conhecidos esses incidentes dispersos, que em nada depõem contra o trabalho dos nossos investigadores e que pertencem hoje á historia da affecção no Brasil. Instructivo, porque desse exame se evidenciam as difficuldades que pode, ás vezes, comportar o diagnostico da raiva epizootica das grandes especies domesticas. Essa revisão mostrará, além disso, como eram absurdas pelo menos algumas dessas confusões, como no caso da doença de Aujeszky, cujas caracteristicas epidemiologicas, clinicas e experimentaes, são tão diversas das que apresenta o quadro classico de raiva no Brasil.

Formou-se assim, não ha como fugir á imagem, uma longa tempestade num copo d'agua! E o que é curioso assignalar é que essas confusões, hoje desfeitas, perduram no entanto, repetidas em publicações estrangeiras recentes.

Recordando essas duvidas e confusões, teremos occasião de examinar outras que a litteratura de outras regiões registra. Assim serão postas em destaque as difficuldades que póde comportar o diagnostico da raiva, especialmente na *identificação* de fócos novos em pathologia animal e nos casos atypicos em pathologia humana. E esses casos de pathologia animal se verificam repetidos em logares distantes, na Argelia, na ilha de Trinidad, na Russia. Seremos assim conduzidos a examinar, embora rapidamente, o diagnostico differencial da raiva.

* * *

As primeiras contestações

Dois são os casos occorridos na litteratura, contendo contestações ao diagnostico da raiva no Brasil: o caso de KRAUS (28-29) e o de LECLAINCHE (30). Ambas as contestações foram acceitas por REMLINGER e BAILLY (52), em uma revista sobre o assumpto. Dahi a repercussão que esses factos tiveram.

O primeiro engano é o caso bem conhecido de KRAUS. Trabalhando no fóco de raiva verificado em Sta. Catharina, REHAAG, a pedido do prof. CARINI, lhe remette uma amostra de virus. Essa amostra creou uma grande confusão. O material é remettido a KRAUS (29) e este conclue que a doença em causa, responsavel pela epizootia reinante, era a doença de Aujeszky e não a raiva!

E' naturalmente difficil, sem poder examinar de novo o material de que se serviu KRAUS, dizer hoje se lhe assistia razão em affirmar que o virus com que trabalhára se comportara como um virus pseudo-rabico e não como um virus rabico authentico.

A occurrencia de um caso de «peste de coçar» num fóco de raiva, explicaria bem os factos, dando razão a todos. E' porém impossivel chegar a uma verificação definitiva.

Parece no entanto pouco provavel, á luz dos dados que ainda é possivel examinar, nos trabalhos sobre a raiva em Sta. Catharina, que a occurrencia das duas affecções se tenha verificado. Ha uma serie de observações que falam contra essa hypothese.

Quasi todos os autores que estudaram os fócos occorridos em épocas diversas, no littoral do Estado de Sta. Catharina, desde CARINI, PARREIRAS HORTA e mesmo STROPPA, registram casos de *raiva acompanhada de prurido cutaneo*. FROHNER e ZWICK (20) no seu tratado dão, aliás, uma boa photographia de raiva acompanhada de prurido cutaneo, no cão.

A convicção que se estabelece em nosso espirito, da legitimidade desses diagnosticos, nesses casos particulares em que o prurido

existia, — reside em provas fragmentarias, mas accordes: ou na presença de corpusculos de Negri, ou no resultado das inoculações praticadas, ou na evolução e na duração do curso clinico. Quasi todos os casos de HAUPT e REHAAG estão desse modo afastados de uma confusão com a doença de Aujeszky, cuja duração rapida é de 24-48 horas, sem paralysias iniciaes. Tivemos occasião de analysar mais longamente esse ponto em um trabalho recente sobre a doença de Aujeszky (14).

O trabalho de KRAUS é contestado por um artigo de CARINI (12), lembrando uma serie de factores conhecidos que servem de supporte a um diagnostico differencial entre as duas affecções: periodo de incubação, decurso, symptomatologia da doença natural e experimental, ausencia de virus no sangue e nos orgãos, virulencia da saliva, impossibilidade de transmissão por via sub-cutanea e por via digestiva, presença de corpusculos de Negri.

Outros dados colhidos pela experimentação eram, além disso, obtidos, e podem ser lembrados particularmente os ensaios de MOSES e os de TORRES (68) sobre immunidade cruzada, além das conclusões retiradas, cada dia, das vaccinações largamente realisadas.

A questão está definitivamente fechada. KRAUS e DURAN (28), em trabalho de 1932, reparam o engano, fazem uma revista das epizootias do sul do Brasil, do Paraguay e da Argentina, e concluem confirmando tudo o que se sabia a respeito. Persistem porém os mesmos autores em afirmar que o virus que haviam recebido de Sta. Catharina era da doença de Aujeszky!

E' curioso assignalar como essas confusões perduram, quando publicadas em revistas de larga projecção. Recentemente, VERGE (75), analysando um trabalho de HURST e PAWAN, sobre a raiva em Trinidad, onde ha referencias á doença no Brasil, escreve que essas epizootias devem ser relacionadas á doença de Aujeszky. LIGNIERES (32) se referia na Ac. Vet. de Paris, á doença de Aujeszky na Argentina, onde dera os melhores resultados uma vaccina chloroformada. Em realidade, conforme informações que devemos á gentileza de QUIROGA, a paralysia bulbar infecciosa não foi assignalada na Argentina e a vaccina em questão é preparada contra a raiva. LOURENS (33) incorre no mesmo engano, e escreve mesmo que os estudos sobre transmissão pelos morcegos, feitos entre nós, se referiam á doença de Aujeszky.

Os enganos em relação ás epizootias de raiva no Brasil, deixando que o juizo de muitos, estranhos ao nosso meio, permanecesse suspenso, — tiveram no entanto sua maior razão de ser deante de uma publicação de REMLINGER e BAILLY, que endossam o reparo de

Leclainche e a conclusão de Kraus, ao lado de outras confusões, como vamos ver.

* * *

As duvidas em torno do segundo caso nasceram com o artigo de Alves de Sousa (3) sobre a raiva no Estado do Rio Grande do Sul. O artigo é analysado por Leclainche (30) em 1928, que estranha e faz acompanhar de signaes de admiração, os dados relativos ao periodo de incubação e insere uma nota incisiva, assim redigida:

«O erro de diagnostico é evidente, mesmo fora de toda pesquiza anatomica ou experimental. Diz-se que só no districto de Belem assignalam-se, no anno, 1.632 mortos, dos quaes 1.175 bovinos, 428 cavallos, 16 porcos, 112 carneiros e um cão».

A objecção apparecia numa excellente revista de pathologia animal e pela autoridade do autor, teve certamente larga repercussão, sobretudo nos meios preoccupados com esses problemas. Durante varios annos, sendo a contestação propagada em outros trabalhos, se continuou a pensar, lá fóra, que se tratava mesmo de um erro evidente. Entre nós, no entanto, com excepção do artigo de Bruno (9-10), existia a convicção de que as cousas estavam certas, embóra os pontos obscuros que restavam a esclarecer. O cão não explicava, ou não parecia explicar, todo o desenvolvimento e toda a extensão dos surtos infecciosos.

Se os dados contidos no artigo de Alves de Sousa permittiam a um pesquisador collocado a distancia, como Leclainche, duvidar do que se passava aqui, deve-se observar que se tratava ali principalmente de realisar um diagnostico da doença. Em realidade fazia-se necessario um estudo bem conduzido da pathogenia da infecção, e esse ponto ainda não havia sido tocado, pelo menos em relação ao fóco do extremo sul do Paiz.

Em 1931, em um estudo sob o titulo «As confusões entre os virus neurotropicos e o virus rabico. Meios de evital-as» — Remlinger e Bailly (52) contam um engano em que iam incorrendo, em relação a um virus isolado do cão e aproveitam o caso para recordar uma serie de confusões entre o virus rabico e os virus visinhos. Esses casos, retirados da litteratura, se referem a diagnosticos errados, ou de resultado difficil, em casos humanos e em casos entre os animaes, apezar da individualidade bem acentuada do virus rabico.

Os enganos nos casos humanos se deram com a encephalite epidemica e a encephalite herpetica. Em pathologia animal as confusões se referem á doença de Aujeszky, a uma supposta encephalite contagiosa dos bovinos e á meningo-myelite dos cães novos. Depois desses casos, ha outros na litteratura, especialmente o caso da meningo-

encephalo-myelite do cavallo, estudada na Russia e que pelo que se sabe hoje, pelo menos em alguns casos, deve ser apenas a raiva.

Devemos recordar aqui unicamente os casos de pathologia animal. Um dos casos humanos, pela sua importancia, merece ser rapidamente referido; é o caso de Koritschöner:

Um homem de 46 annos é mordido ao nivel do dedo grande do pé, em 13-3-923, por um cão seguramente raivoso. Do dia 14 ao dia 27, durante 14 dias portanto, é submettido ao tratamento anti-rabico em Vienna. No dia 20-4-923, isto é, 24 dias depois da ultima inoculação e 38 depois da mordedura, é levado agonisante ao hospital, com dores abdominaes, febre, perturbações da deglutição. Morre no dia seguinte, sem diagnostico. A hesitação oscillava entre raiva, encephalite epidemica e meningite. Havia regidez da nuca, riso sardonico e contracturas.

A autopsia é feita por KORITSCHÖNER que, pelas lesões macroscopicas e microscopicas, conclue pela encephalite epidemica. No systema nervoso do paciente e dos coelhos inoculados, os corpusculos de Negri não são encontrados. Os coelhos inoculados reagem ao cabo de 6 e mesmo 4 dias de incubação e apresentam uma paralysia de curta duração, seguida de morte.

Esse virus de Koritschöner «fez correr muita tinta»; é estudado por LAGER, LAUDA, SILBERSTEIN, DOERR, ZDANSKY... etc. Resaltando as particularidades do caso clinico, DOERR acha que, apesar da ausencia das inclusões de Negri, o virus em causa deve ser separado dos virus encephalicos e approximado do virus rabico. Convem lembrar que havia antecedentes de infecção rabica, mas que o tratamento foi conduzido dentro das melhores condições de tempo.

O acerto da affirmativa de DOERR, feita a priori, é bem demonstrado, de um lado por SCHWEINBURG e independentemente por NICOLAU, de outro. SCHWEINBURG estuda a acção de sôros de coelhos immunizados contra o virus fixo, contra o virus de rua, contra o virus herpetico, contra o virus da encephalite e contra o virus de KORITSCHÖNER, — sobre esses diversos virus e conclue que esse ultimo é mesmo um virus rabico. NICOLAU chega por outros caminhos á mesma conclusão: a virulencia do virus para o cão, a ausencia de poder pathogenico para a cornea, a evolução da doença experimental, os caracteres das lesões histologicas e sobretudo as experiencias de immunidade cruzada, permittem affirmar que o virus de Koritschöner *é um virus rabico um tanto especial, matando o coelho em 4-5 dias, mas é de qualquer modo um virus rabico*. KORITSCHÖNER havia descripto corpusculos da encephalite, que eram, em realidade, corpusculos de Negri.

O trabalho de REMLINGER e BAILLY recorda ainda o caso de Kobayashi, o virus D K, estudado por NICOLAU e KOPCIOSKA, o virus de Silberstein, sobre os quaes não seria possivel insistir.

Examinemos os casos que os autores franceses referem em pathologia animal.

Em primeiro lugar elles relatam justamente o caso de KRAUS, fazendo larga propagação de um engano. Em segundo lugar, retomam a contestação de LECLAINCHE ao diagnostico de ALVES DE SOUSA, no Rio Grande do Sul, e escrevem:

«Uma doença desde longos annos descripta sob o nome de «peste das cadeiras», grassa em certos pontos do Brasil e principalmente no litoral do estado do Rio Grande do Sul. Ella attinge os bovinos e cavallos. Em razão da presença de corpusculos de Negri e da existencia de lesões ganglionares de Van Gahuchten e Nelis, os veterinarios brasileiros acreditaram poder identificar a doença á raiva e tal é, em particular, a opinião de Alves de Sousa, que tendo constatado o poder pathogenico do cerebro para o cão e para o coelho, conclue que não se pode tratar senão de raiva». E, mais adeante: «Parece que no estado do Rio Grande do Sul, como no de Sta. Catharina, se tenha tratado de doença de Aujeszky e que melhor divulgado, o engano de Carini e de Haupt e Rehaag teria evitado sua repetição».

Mais tarde, os pesquisadores de Tanger (53) corrigem o engano. Acceitam a conclusão de que o diagnostico dos autores brasileiros estava certo e, examinando um virus que lhes é remettido, se dispensam mesmo de realisar provas de immunidade cruzada.

* * *

Outros enganos existem, em outros paizes. Sua enumeração obriga-nos a alongar este trabalho.

O caso da Argelia. O caso de DONATIEN e BOSSELUT (16), do Instituto Pasteur de Alger, não é menos interessante. Em 1926, quando estudamos a epizootia do Paraná, referimos esse engano e chamamos a attenção, em collaboração com FREITAS LIMA e CASTILHO, para a possibilidade dessas confusões, sobretudo entre nós, onde algumas doenças ainda não foram objecto de nenhum trabalho de identificação.

DONATIEN e BOSSELUT encontram na Algeria uma affecção grassando entre bovinos. No espaço de dous mezes, em uma criação de 20 animaes, dez adoeceram e nove morreram. A ausencia de paralysias e de glycosuria falam contra a raiva. O encephalo, a medulla, a retina, são virulentos e o virus é filtravel em Chamberland L. E' pathogenico para bezerro, coelho, cão, carneiro, macaco, burro, cobaia. O caracter mais constante da doença experimental é a rapidez de evolução; esta se processa em 24 horas. A transmissão por inoculação de material de glandulas salivares é impossivel.

E' um virus neurotropico, offerecendo numerosas semelhanças com o virus rabico, e os autores descrevem uma encephalite aguda contagiosa dos bovinos. Tres annos mais tarde, DONATIEN (15) corrige o engano, escrevendo e falando, no curso de Pathologia Tropical de Alfort: «é frequente observarem-se na Argelia casos atipicos de raiva nos herbivoros». A immunidade cruzada corrige o engano e afasta as duvidas.

O ultimo caso dessa natureza deu-se com REMLINGER e BAILLY (52) e a confusão se fez entre a raiva e forma nervosa da doença de Carré, meningomyelite dos cães novos. Os tratadistas veterinarios estudam longamente as possibilidades dessa confusão, *na clinica.* Aqui, porém, a confusão se fez no estudo experimental do virus e dura até a 5.ª passagem, quando os symptomas da raiva se mostram de modo claro. A confusão durára dous mezes.

* * *

A esses casos podemos hoje acrescentar outros mais, occorridos depois. Assim o caso da ilha de Trinidad, em que a raiva foi a principio rotulada de

botulismo, e o caso da Russia, em que a meningo-encephalo-myelite do cavallo, em numerosos casos, deve referir-se á raiva. O caso de Trinidad será examinado quando tratarmos das epizootias alli verificadas. Examinemos o caso da Russia.

Descreveram alli alguns autores uma meningo-encephalo-myelite do cavallo, que até agora era assim conhecida. Em uma publicação recente, VICHELESSKY, NASKOV, SOUKOF e MOUTINE (76) discordam desse diagnostico e fornecem dados que vamos resumir:

A doença, conhecida ha muito tempo na Russia, invade, a partir de 1931 até 1934, territorios importantes. BALL, em 10 exames histologicos, acha que não se trata da doença de Borna dos autores allemães.. Um diplococco é isolado e incriminado, revivendo assim a velha theoria creada para a doença de Borna e que cahiu ha muito.. Fala-se ainda na possibilidade de uma intoxicação primitiva do figado, com symptomas nervosos secundarios; outras hypotheses surgem: cogumelo, anaerobios produzindo toxinas, intoxicações vegetaes, espirochetose.

Em 1931-32 procuraram approximar a doença da estudada por JOEST e DEGEN, da descripta por MOUSSU e MARCHAND, da encephalite do cavallo estudada nos E. Unidos. Em 1933, VECHÉLESSKY e BOUCHNEF isolam um virus e LOVENBERG infecta o coelho. As duvidas residiam entre doença de Borna e encephalite dos autores americanos.

A symptomatologia descripta pelos autores russos se enquadra perfeitamente na que se vê na raiva paralytica do cavallo no Brasil: phases de abatimento, de excitação e depressão, difficuldade da marcha, somnolencia, cabeça pendida; ha paralysia da deglutição, paralysias dos membros, da bexiga e dos intestinos, tremores musculares, trismus, rangido de dentes, sialorréa; durante as phases de excitação ha movimentos para frente e para traz, movimentos lateraes do corpo, quedas, levantando-se as vezes o doente sobre suas patas trazeiras.

A inoculação ao coelho dá periodo de incubação de um mez, que cae ao cabo de 10 passagens, a 4-5 dias. Corpusculos de Negri não são vistos.

Um sôro de cavallo, preparado com esse virus, neutraliza o virus rabico e não neutraliza nem o virus da doença de Borna, fornecido por Zwick, nem os virus da encephalite americana.

Tudo está indicando, portanto, que em alguns casos, a encephalo-myelite do cavallo da Russia, — é ainda a raiva!

A leitura desse trabalho é interessante. Os casos de raiva nos solipedes, vistos entre nós, não só os que tivemos ensejo de ver no Paraná, como esses mais recentes verificados em Itú, aqui em S. Paulo, têm uma symptomatologia semelhante. Dahi o interesse que apparece ainda hoje, do ponto sobre o qual insistimos em 1927, quando diziamos que ha necessidade de estabelecer com prudencia o diagnostico differencial entre essas affecções.

* * *

Como se vê, a identificação dos fócos de raiva paralytica dos grandes animaes, em diversas regiões, não tem sido um problema facil. Parece que uma das razões dessas difficuldades reside no facto dos tratados, nas suas descripções, insistirem de preferencia na raiva furiosa, que não é tão frequente nessas epizootias mais ou menos identicas.

Os numerosos fócos de raiva das grandes especies, em diversas regiões, na Africa do Norte, em Trinidad, na Russia, passaram por uma phase de duvidas que a litteratura assignala.

Apezar da serie de enganos, pode-se affirmar que o laboratorio, auxiliado pela clinica, pelos dados epidemiologicos, cuidadosamente reunidos e interpretados, dispõe, sem duvida alguma, de meios precisos de fornecer um resultado seguro. Pode-se mesmo acrescentar que nos casos communs, o diagnostico experimental da raiva é um problema facil de rotina de laboratorio. Os meios de que dispomos são, como se sabe, a inoculação no coelho e na cobaia, no cão, em bovinos, nas outras especies, si necessario, a pesquisa de corpusculos de Negri, das lesões histologicas dos ganglios nervosos, a presença da glycosuria, etc. E' claro que ficam excluidos os casos atypicos, de virus tambem atypicos, afastando-se do quadro classico. Nesses casos, as provas decisivas de immunidade cruzada resolvem, em ultima instancia, todas as duvidas.

REMLINGER e BAILLY (52) vinham insistir em 1931, com a sua reconhecida autoridade, no interesse das provas de immunidade cruzada, sobre cuja importancia falavamos (13-19), estudando em 1926, o diagnostico differencial da raiva.

V — AS EPIZOOTIAS DA ILHA DE TRINIDAD E OS CASOS DE RAIVA PARALYTICA DO HOMEM.

Na ilha de Trinidad, a maior das pequenas Antilhas, colonia ingleza, de 387 mil habitantes, apparecia em 1925, no mez de Julho, entre novilhas pastando nos suburbios de Port of Spain, uma doença mortifera em que os principaes symptomas eram sialorréa, constipação, perturbações da marcha a principio, seguidas de franca paralysia (34). Os primeiros informes sobre a epidemia de Trinidad foram-nos fornecidos por METIVIER, pessoalmente. Elle publicou depois um bem documentado artigo aqui referido. Trabalhando como veterinario do governo inglez na ilha, elle tem das epizootias uma experiencia autorisada.

As suspeitas se orientam, de inicio, para as plantas toxicas. Vegetaes incriminados, recolhidos e examinados, deram resultado negativo. Um maior numero de casos occorria em effectivos maiores e a incidencia era de 20 %, sendo todos os casos fataes. Certo numero de factos nortearam a investigação e deram, mais tarde, a trilha do diagnostico; são elles, como resume METIVIER (34):

I — A doença só attingia os animaes no pas[illegible]. O gado estabulado era poupado. Foi essa a primeira constatação.

II — Estabulando-se todo o gado, casos ainda occorriam no gado estabulado proveniente do campo.

III — O gado do campo, collocado em curraes, adoecia ainda, mas o contagio não se fazia ao gado sempre estabulado. A transmissão não se fazia pois, por contagio directo.

IV — As autopsias nada orientavam. Apenas se viam lesões congestivas da mucosa do coagulador.

Esses factos eram constantes e confirmados em varios fócos.

Em fins de 1925 e começo de 1926, novos surtos se verificam. Em 1927 um facto, surpreendente á primeira vista, vem crear certa confusão: surgem casos, contrariamente ao que se vira antes, em animaes estabulados. A explicação para esse facto não tardou: constatou-se que os colonos abrigavam seus animaes em curraes abertos, protegidos por simples coberta rustica e sem paredes.

Nos annos seguintes, durante a secca, o numero de casos parecia diminuir. Os fócos surgiam em zonas dispostas irregularmente e, ás vezes, no meio de uma serie de fócos, permanecia certa area livre, o que parecia inexplicavel.

A partir de 1929 o mal toma aspectos mais graves. Em 1929-30-31 o numero de casos ia a uma média de mil por anno. Verifica-se que 90 % dos animaes attingidos eram bovinos; numa frequencia descendente, eram victimados o cavallo, o burro, a cabra, o carneiro e o porco. Apenas dous casos são constatados no cão.

Um primeiro diagnostico, firmado por pesquisadores americanos, responsabilisava o botulismo. No entanto não foi possivel reproduzir a infecção utilisando culturas de germens isolados desses fócos, nem o emprego da anatoxina botulinica conseguiu diminuir a mortalidade.

Em fins de 1929 o diagnostico permanecia suspenso. Foi quando surgiram casos de uma doença humana, manifestando-se sob a forma de uma paralysia ascendente, sem diagnostico a principio e com um caracter de gravidade assignalado pelo facto de serem todos casos fataes. Parece que foram esses casos humanos que deram direcção certa ao diagnostico da epizootia. A principio a doença humana pareceu uma poliomyelite, e somos levados a acreditar que os pesquisadores americanos estiveram, durante algum tempo, orientados nesse sentido; como se vê pelos trabalhos realisados, toda uma serie de experiencias foi emprehendida por inoculações ao macaco.

Em 1931, a experiencia seriada clareava definitivamente os factos. PAWAN (34), examinando material de cerebros humanos e de macacos inoculados, encontra inclusões intracellulares que lembraram corpusculos de Negri. Material desses primeiros casos é remettido a HURST e a FLEXNER, que concluiram ser raiva a affecção humana. FLEXNER e HURST examinam depois material de bovinos e vêm que se trata ainda de raiva. HURST (26) lembra então a occurrencia de identicas epizootias no Brasil, nos quaes o vector era desconhecido e o morcego incriminado. Material desses casos é ainda remettido a ROUX, em Paris, a ANDREWS, em Weybridge, a FINZI, em Milão. REMLINGER e

Bailly (54) estudam depois o virus de Trinidad. As confirmações eram então accordes.

Hurst e Pawan (26) escreviam, em 1931, um relato preliminar da epidemia de Trinidad, na qual o quadro clinico surgia sob a forma de uma myelite aguda ascendente, occorrendo durante a estação chuvosa de 1929-30. A affecção, que parecia uma forma de poliomyelite, era dada pelo virus rabico. Dezesete colonos, tres indianos e quatorze negros, vieram a fallecer. O achado era o mais surprehendente possivel, porque nenhum caso typico de raiva humana occorrera, nenhum cão raivoso fôra visto na ilha e a origem da infecção parecia mysteriosa. A hypothese do morcego é então levantada para explicar os casos humanos e animaes.

Em um trabalho de 1932, Hurst e Pawan (27) estudam novos casos de myelite ascendente do homem e de raiva paralytica dos animaes. Novos dados retirados de pesquizas histologicas e de inoculações documentam o diagnostico de raiva, e o estudo experimental é feito no macaco e no coelho. As observações de alguns casos humanos são curiosas e impressionantes; ellas serão analysadas quando estudarmos o papel dos morcegos.

Cinco casos em bovinos servem de ponto de partida aos estudos dos autores americanos. As primeiras inoculações parecem mais seguras quando feitas no macaco; as passagens no coelho são, a principio, de resultados incostante (1). As lesões histologicas da infecção experimental no macaco são muito discretas ou, em alguns casos, apenas lesões inflammatorias, diffusas em todo o systema nervoso. Corpusculos de Negri são vistos em todos os casos de inoculação positiva. A prova de immunidade cruzada é feita em coelhos immunizados com series de emulsões phenicadas do virus fixo; os coelhos resistem, depois disso, á inoculação intra-cerebral de Occ. 25 de uma emulsão de substancia nervosa de cerebro a 0,5 %, como dose infectante. Os ensaios de neutralização do virus conduzem a resultados concordantes (2).

Remlinger e Bailly (54), que estudaram o virus, fazem notar que em clinica e em epidemiologia deve-se pensar em raiva deante do syndrome de Landry e que se ha casos *isolados* em que o interrogatorio não esclarece a causa, o episodio de Trindade era o unico em que o mecanismo de infecção era ignorado para a totalidade dos doentes. Examinaremos de novo esses casos, no capitulo sobre os morcegos.

(1) É uma observação que deve ser mais ou menos geral, no isolamento do virus rabico. Parece-nos sempre de boa pratica inocular varios animaes. Si alguns animaes vêm morrer accidentalmente, o resultado não fica compromettido. Adoptamos a precaução de inocular varios coelhos por via sub-dural e cobaias por via sub-dural e nos musculos da nuca. Ainda recentemente, em tres opportunidaddes diversas, o resultado foi satisfatorio. Os resultados de cobaia trazem mais segurança, ou confirmam os do coelho.

(2) Este trabalho estava concluido quando chegou ás nossas mãos um outro trabalho de Pawan sobre a raiva em Trinidad (Annals of Tropical Medicine and Parasitology, vol. 30, n.o 1, p. 101. 1936).

A raiva no Paraguay e na Argentina

Uma doença semelhante á que tem sido vista no Brasil devia existir desde longos annos no Paraguay, grassando mesmo alli ha mais de 15 annos.

A partir de 1928 relata ROSENBUSCH (57-58), o mal de cadeiras dos bovinos adquire caracter alarmante e se estende a todo o Paiz, tomando o caracter de uma epizootia que causou grandes prejuizos, matando varios milhares de animaes. Numa invasão progressiva por todo o Paraguay e Chaco paraguayo, a enfermidade ameaça a fronteira argentina, tendo sido mesmo registrados casos em territorio argentino.

Ella foi estudada em 1931 sob o nome de paraplegia enzootica, ou mal de cadeiras. Em alguns districtos, 50 % dos animaes eram victimados. Suspeitou-se a principio que se tratasse de intoxicação por planta, e as suspeitas recahiram sobre *Ipomhea digitata*. Como occorreu no Rio Grande do Sul, um diagnostico de septicemia hemorrhagica foi igualmente estabelecido.

No Congresso Nacional de Veterinaria de Montevideu, em dezembro de 1930, ROSENBUSCH relata os resultados de investigações feitas com material proveniente do Paraguay e enviado por MIGONE, concluindo pela raiva. A mesma conclusão é trazida por COSTA, em 1931, e ACOSTA, por estudos realizados em Corrientes, Formosa e Chaco.

MIGONE e PENA (35), em 1931, concluiram igualmente que se tratava de raiva, embora tenham assignalado haver differenças de virulencia do virus.

O diagnostico foi baseado na presença de corpusculos de Negri, na reproducção experimental em coelhos, com um periodo de incubação variando de 17 a 30 dias, na presença de glycosuria, na semelhança do quadro clinico com o da doença estudada no Brasil e na Argentina. Os autores chamam a attenção para a raridade dos casos humanos e no cão; assignalam ainda que os casos são mais frequentes entre animaes que vivem proximo dos montes. Referem os trabalhos brasileiros de CARINI, PARREIRAS HORTA, HAUPT e REHAAG, ALVES DE SOUZA, CARNEIRO e FREITAS LIMA e os de ROSENBUSCH na Argentina.

O periodo médio de incubação é de 2 a 2 mezes e meio, na infecção natural. A epizootia alcança sua maior gravidade 3-10 e ás vezes 20 mezes depois de iniciada. Uma vaccina chloroformada foi preparada na Argentina.

O virus argentino é estudado depois por REMLINGER e BAILLY (53), que constatam resultados de tal modo typicos para um diagnostico de raiva, que se dispensam de realizar provas de immunidade cruzada.

Recentemente, o Congresso argentino votava um credito para organização de uma campanha antirabica no Paiz; isso indica que a doença continua a existir em certas zonas.

Na Guyana ingleza, nas vizinhanças de Dadanawa, a raiva foi vista igualmente com o mesmo caracter epizootico, conforme refere Torres (69), sendo alguns casos verificados no Alto Rio Branco, em territorio brasileiro.

VI — A TRANSMISSÃO DA RAIVA PELOS MORCEGOS HEMATOPHAGOS

I — *Estudo experimental.*

a — Supposições e primeiras observações.
b — Conclusões de Haupt e Rehaag em Santa Catharina (1921).
c — Experiencias de Queiroz Lima e Salles em Matto Grosso.
d — Ensaios de Queiroz Lima e Torres.
e — Verificações de Hurst e Pawan em Trinidad.

II — *Estudo do morcego.*

a — Classificação das especies hematophagas.
b — Habitat, captura, etc.
c — Criação em captiveiro, alimentação artificial.
d — Luta contra o morcego na prophylaxia antirabica.
e — A raiva no morcego.

A transmissão da raiva pelos morcegos hematophagos, apparecendo como um facto novo e imprevisto, em uma affecção de epidemiologia classica, bem estabelecida desde longos annos, constitue um dos aspectos mais importantes das acquisições modernas. E a importancia fundamental do facto se destaca melhor, quando se recorda que elle se mostra ao mesmo tempo na etiopathogenia da infecção humana e animal.

Não nos seria possivel examinar longamente esse ponto; vamos apenas assignalar os factos essenciaes, faltando-nos experiencia propria do assumpto. Alem disso, o material até agora estudado é restricto. Maiores referencias, interessando os especialistas, estão nos trabalhos referidos.

A primeira referencia ao possivel papel do morcego se vê no trabalho de Carini (11).

A presença de cães raivosos é assignalada nas localidades assoladas, no litoral do Estado de Sta. Catharina. O seu numero não parece, no entanto, em proporção com o dos bovinos e equinos victimados. Alem disso, em São Pedro de Alcantara, localidade flagellada, pessoas dignas de credito asseguram ter visto morcegos, em pleno

dia, se atirarem sobre bovinos, nas pastagens, e mordel-os. Algum tempo depois, todos esses animaes teriam morrido de raiva.

A observação pertence aos colonos da região, o que é curioso assignalar. Facto identico se verifica no que concerne á transmissão da febre do Texas, supposta pelos creadores daquella região.

PARREIRAS HORTA (43) fala de casos de raiva no cão e no cão do matto, observando que não ha superposição da area da affecção entre as grandes especies, sobre a area da raiva canina, e accrescenta «a attenção publica se tem voltado para o morcego, e é commum encontrarem-se proprietarios que ligam o apparecimento de casos de raiva entre bois e cavallos, a mordeduras desse chiropteros». Os morcegos mordem mesmo durante o dia. Um *Phallostoma hastatum,* capturado, não revela presença de virus no cerebro.

HAUPT e REHAAG (21-22-23 e 24) trabalhando na zona de colonização allemã de Sta. Catharina, em 1916-17, publicam mais tarde o seu trabalho. Procuram situar exactamente, o local e a extensão dos fócos e o papel das mattas lhes parece innegavel, sem que, de inicio, maiores esclarecimentos possam ser alcançados a respeito. Esses autores se occupam alli, do morcego. Deve-se-lhes o merito de haverem focalizado com insistencia o problema, que ficou depois abandonado.

E' estranho que depois de publicarem seu trabalho «raiva epizootica transmittida pelos morcegos», tenham elles abandonado o assumpto, que devia dar abundante material de demonstração. As experiencias de HAUPT e REHAAG, feitas no campo, não podiam ser cercadas do rigor necessario, deixando duvidas; e o assumpto permanece esquecido.

A objecção mais séria que se podia fazer, de um modo geral, ás experiencias de HAUPT e REHAAG, é que ellas não permittiam excluir totalmente um possivel contagio pelo cão ou por outro animal, feita em época anterior ao isolamento dos animaes na zona flagellada, pois, como se sabe, o periodo de incubação é longo e, ás vezes, muito variavel, na infecção natural. Alem disso, a comprovação do diagnostico experimental é as vezes incompleta. De modo que sendo de 1921 o trabalho desses autores, durante dez annos o assumpto não avançou.

Algumas observações são no entanto importantes e devem ser relatadas:

Em primeiro logar ellas constatam o que se verifica mais tarde, repetido em Trinidad: os animaes estabulados não adoecem e os animaes soltos durante a noite são victimados na proporção de 50 %. Em segundo logar, verificam em um estabulo protegido por tela de arame, a penetração de um morcego, feita atravez um buraco da parede,

occasionado pelo coice de uma vacca. Esse facto se deu 35 dias depois de terem sido alli collocados os animaes. Em dous bovinos alli abrigados, verificam lesões da pelle produzidas por mordedura de morcego: um desses adoece 21 dias depois. No mesmo estabulo, em uma semana, adoecem mais 4 bovinos.

A terceira observação parece mais elucidativa: um colono captura em 1-7-914 um morcego que mordera um bezerro de 8 dias. O cerebro do morcego não serviu a maiores investigações. As lesões da pelle do bezerro foram bem verificadas e correspondiam, pela disposição, á situação dos incisivos superiores do morcego. 28 dias depois do accidente, o bezerro adoece, com rigidez do pescoço, agitando a cabeça. Não foram feitas outras pesquizas.

Finalmente, de um morcego capturado Haupt e Rehaag retiram material de cerebro e innoculam coelhos e cobaias, que morrem em 13 dias. Passagem, ou outras verificações não foram realisadas. No cerebro de morcegos elles dizem ter encontrado inclusões coradas pela eosina.

Torres e Queiroz Lima (73) observam que os morcegos *Desmodontidae* estiveram, durante muito tempo, na familia *Phyllostomidae*. Dos dados de Haupt e Rehaag parece claro que elles tiveram deante de si, authenticos hematóphagos. Deve-se lembrar o detalhe curioso que vae atraz assignalado: a presença das lesões typicas na pelle dos animaes.

Blanc de Freitas (7), mais tarde, no Espirito Santo, verifica sensibilidade de certas especies frugiforas ao virus rabico.

* * *

A questão foi retomada nesses ultimos annos no Brasil e na ilha de Trinidad. No Brasil os ensaios foram feitos no fóco de Matto Grosso e no de Sta. Catharina.

Experiencias em Matto Grosso — Entre nós, Queiroz Lima (46), que chefiava em Matto Grosso a Commissão de Prophylaxia da Raiva, concluia o relatorio de 1931 com os seguintes dados:

I — A raiva bovina não é transmittida pelo cão, que é poupado pelas epizootias, nem pelos pequenos animaes dos generos *Felis* e *Canis*. O veado campeiro (Hippocamelus Bezoarticus), a anta (Tapirus Americanus) e o bugio (Allouata caraya) são sujeitos á doença, mas não são os transmissores. Ha uma coincidencia notavel no se constatar que as epizootias de Matto Grosso e o habitat dos morcegos hematóphagos têm a mesma area de distribuição; ella se limita á zona montanhosa das mattas e aos campos cerrados.

II — Experiencias estão sendo realisadas com o *Desmodus rotundus*, Geoffroy, que é o provavel transmissor da epizootia.

Deve-se notar que esses dados de ordem epidemiologica, excluindo o cão e os animaes selvagens, partiam de um technico particularmente autorisado, porque viveu e trabalhou durante longos annos na região. Em geral, um inquerito epidemiologico, feito em dias de viagem, é falho de dados precisos, contendo informes vagos, ás vezes contraditorios. Em vastas zonas, é difficil, desse modo, reunir dados que correspondam a observações reaes. E parece innegavel que o primeiro trabalho na elucidação definitiva da causa dessas epizootias devia consistir em afastar, de modo seguro, os transmissores habituaes.

Queiroz Lima e Salles (50) publicam, em Setembro de 1933, uma nota relativa aos primeiros ensaios em Matto Grosso; concluem:

I — Morcegos hematóphagos não se infectaram sugando bovinos raivosos.

II — Um morcego inoculado de raiva póde infectar outro morcego.

III — O *D. rotundus* inoculado com o virus rabico, mesmo sem revelar symptomas, alimentando-se repetidamente em bovinos, póde transmittir a esses animaes a infecção, dentro de 1 a 4 mezes. As glandulas salivares de um *D. rotundus* eram infectantes cinco mezes depois da inoculação experimental.

Até aqui, como se vê, a experiencia inversa, reproduzindo as condições naturaes, não havia sido realisada: fazer morcegos hematóphagos apanhados no fóco e não inoculados, se alimentarem em bovinos sãos, realisando assim o que se deve passar na natureza. A terceira conclusão acima é, porém, de maior importancia.

Torres (69), em fins de 1933, em uma serie de morcegos capturados em Matto Grosso, consegue verificar que apenas um era portador de virus.

As experiencias em Sta. Catharina — Queiroz Lima (48), em 1934, insiste na questão já referida, relativa á area geographica da zoonose em Sta. Catharina, coincidindo com a area dos morcegos.

Em Camboriú, villa proxima do littoral de Sta. Catharina, o mesmo autor surprehende um fóco de raiva, onde 60 % do gado é victimado. Ahi, em um abrigo onde pernoitam 6 cavallos e 2 vaccas, no espaço de 21 dias, morrem 5 cavallos e as duas vaccas, todos com symptomas typicos.

Um *primeiro* morcego, apanhado nesse curral em 25-10-933, serve de ponto de partida para as primeiras inoculações a coelhos e a bovino.

No coelho, por via sub-dural, as inoculações são positivas ao cabo de tres semanas de incubação; em um bezerro de 8 dias, inoculado na camara anterior do olho, depois de 25 dias de incubação, sobrevêm paralysias, evoluindo

em 5 dias. Corpusculos de Negri são vistos e passagens são positivas. O bezerro foi collocado em abrigo fechado, sob tela de arame e alimentando apenas com leite.

Um *segundo* morcego, capturado vivo, revela presença do virus rabico no cerebro e na saliva.

Um *terceiro* morcego colhido em Itajahy, ainda no litoral de Sta. Catharina, em Fevereiro de 1934, por Camará Martins, serve de ponto de partida ás inoculações; essas são positivas. As passagens são negativas, mas inclusões são verificadas no Instituto de Biologia Animal do Rio de Janeiro (Violantino Santos e W. Pires).

Em conclusão:

Alcançam aqui as experiencias um resultado mais interessante; o de se encontrarem morcegos *naturalmente* infectados pelo virus rabico, apresentando virulencia das grandulas salivares, num estabulo que é um verdadeiro fóco, onde de 8 animaes, 7 morrem de raiva. Queiroz Lima conclue: I — no fóco epizootico da raiva dos herbivoros, o morcego hematóphago contrae naturalmente essa molestia, de que póde morrer. II — mesmo em apparente estado de saude, o morcego pode conter o virus rabico nas glandulas salivares e no cerebro.

A questão collocada nesse ponto, foi continuada no Instituto de Biologia Animal do Rio de Janeiro por Torres e Queiroz Lima (73), em 1934.

As experiencias foram realisadas com morcegos provenientes de Sta. Catharina, nas visinhanças de Brusque, iniciadas alli mesmo e continuadas no Rio, para onde foram transportados os morcegos capturados. Consistiram em verificar dois pontos principaes, que são relatados separadamente:

I — provocar e constatar a infecção natural dos animaes sugados — bezerros e animaes de laboratorio, pelos morcegos hematóphagos, capturados no fóco de raiva.

II — verificar a existencia de morcegos portadores naturaes do virus rabico.

A primeira serie traz conclusões que reproduzem infecção nas condições em que ella se processa na natureza. A segunda verifica a presença do virus rabico em morcegos sãos, vivos, e mesmo em regiões onde não grassa a raiva.

Resumimos do trabalho citado as conclusões que nos parecem mais importantes:

1 — na natureza, nos fócos de raiva e mesmo fóra delles, encontram-se morcegos hematóphagos portadores naturaes e eliminadores do virus.

2 — morcegos portadores do virus transmittem a doença a bovinos, quando os ferem para chupar o sangue. Tres bezerros foram assim infectados e morreram de raiva paralytica.

Esta conclusão é retirada de experiencias em que se fizeram varios morcegos se alimentarem em bezerros e outros animaes, durante longo periodo. De modo que não é possivel precisar o periodo de incubação da infecção natural do bezerro pela picada do morcego: esse deve oscillar, pelo que se vê nos protocollos, entre 46 e 65 dias num caso, 25 a 105 dias em outro, e 36 e 154 dias em um terceiro (Bezerros 28B, 30B e 35B).

3 — Em sua passagem pelo morcego hematóphago o virus parece não soffrer alterações.

4 — Os morcegos infectados naturalmente podem adoecer, apresentando symptomas de raiva paralytica (difficuldade de vôo, perturbações do apôio, paralysia do maxillar e dos musculos do pescoço).

5 — Dos morcegos portadores capturados no fóco de Sta. Catharina, os resultados foram: 5 *D. rotundus,* positivos, em 7 apanhados, e 1 *D. ecaudata,* em 7 capturados.

6 — Os autores acreditam que os morcegos são inicialmente victimas da doença, que se propaga primeiramente entre elles e depois aos animaes por elles feridos.

Deve-se registrar aqui ainda um facto importante: têm sido encontrados numerosos morcegos hematóphagos, colhidos nos fócos, nos quaes não tem sido encontrado o virus. Torres (70), em uma viagem a Matto Grosso, consegue encontrar apenas um portador de virus, em uma captura de 36 exemplares.

Salles (60-61), em 1935, discute o resultado de seus ensaios com Q. Lima.

* * *

Verificações na ilha de Trinidad. Além dos estudos feitos no Brasil, a questão do papel dos morcegos hematóphagos na transmissão da raiva é abordada na ilha de Trinidad.

Em 1931, Hurst e Pawan (26) publicam um relato preliminar da epidemia occorrida naquella colonia ingleza. Nenhuma correlação pôde ser a principio estabelecida entre as epizootias e os casos humanos. Na ausencia de outro transmissor, pensaram mais tarde os pesquisadores americanos que podia ser o morcego, como admittiam Haupt e Rehaag no Brasil.

Em 1932, os mesmos autores americanos (27) estudam novos casos humanos e animaes. Nesse segundo trabalho trazem dados completos de pesquizas histologicas, documentam o diagnostico de raiva

e estudam a infecção experimental no macaco e no coelho. A histologia da raiva humana é ahi longamente tratada.

As primeiras inoculações de cerebros de morcegos apanhados vôando de dia, foram negativas. Posteriormente, a classificação desses animaes mostrou serem elles frugivoros da especie «Artibeus planirostris trinitalis». Mais tarde, no entanto, PAWAN (1932-34) verifica que os Desmodus são tambem frequentes na ilha e são portadores de virus. Os proprios morcegos frugivoros podem ser portadores de virus. Até Agosto de 1934 PAWAN, citado por S. TORRES (72), havia encontrado 21 morcegos portadores de virus.

O trabalho de HURST e PAWAN publicado em 1932, embora ahi elles concluam que ha apenas certa evidencia incriminando o morcego, tem uma serie de observações interessantes: verificam alli casos de raiva humana transmittida por morcegos. Ao todo, 6 observações são referidas e em algumas o interrogatorio permittiu precisar, de modo a não deixar duvidas, o papel do morcego na etio-pathogenia da infecção.

O caso humano numero 3 tem uma historia clinica impressionante. O imprevisto desses achados justifica uma analyse demorada desse caso, que o mais typico da serie.

Uma este-indiana, domestica, de 28 annos, dá entrada no hospital em 7-8-931, com a seguinte historia:

Na noite de 6-7-931 ella sentira, durante o somno, que alguma cousa a tinha picado. Acordou, gritou pelo marido, que accendeu uma lampada e viu manchas de sangue tingindo o lençól, perto de seus pés; de junto do pé da cama vôa nesse momento um morcego. Um exame revela no segundo dedo do membro posterior esquerdo da paciente uma lesão elliptica de menos de $^1/_4$ de pollegada, no seu maior diametro. As duas crianças do casal foram igualmente picadas, mas nada tiveram. Foi observado, na mesma época, que os morcegos estavam mordendo animaes, o que coincidia com o apparecimento de casos do supposto botulismo do gado.

No dia 2-8-931, — 27 dias depois do accidente — a mulher experimenta, ao nivel do pé esquerdo, uma sensação de queimadura, seguida de caimbras. Nota que o pé «sentia morto», insensivel, sendo sua flexão impossivel. Esses symptomas ganham toda a perna e ha prostação. No dia 4, a insensibilidade ganha o pé direito e os symptomas se agravam até entrada no hospital.

Uma descripção clinica completa é encontrada no trabalho. Em resumo:

Em 7-8-31 o exame registra temp. 98, pulso 88, resp. 16; paralysia flacida, anesthesia total, abolição de todos os reflexos da perna esquerda. Condições mentaes normaes. Nem albuminuria, nem glycosuria. As 23 hs., paralysia da perna direita do pé.

Em 8-8-31: incoordenação dos movimentos do braço, prostração, temp. 105, sêde intensa, perturbações respiratorias.

Em 9-8-31: perturbações da deglutição, dyspnéa, perda da consciencia, morte duas horas mais tarde.

A histologia do caso é feita. Corpusculos de Negri não são encontrados. As inoculações dão resultados irregulares no coelho, no inicio, e as passagens

são difficeis. Uma primeira inoculação ao macaco facilita passagens no coelho, com 22 dias de incubação, no macaco, e 10-12 dias no coelho. Corpusculos de Negri são encontrados em todos casos de inoculações positivas. A infecção experimental no macaco dá logar a lesões cellulares muito discretas, só verificaveis por um exame muito cuidadoso, ou, em outros casos, a lesões inflammatorias accentuadas, diffusas, em todo o systema nervoso.

O trabalho fornece os seguintes detalhes relativos aos habitos nocturnos dos colonos da ilha, que explicam a infecção.

Na ilha de Trinidad, as casas de colonos são edificadas com um espaço aberto entre o telhado e a parede, para favorecer a ventilação; essa abertura é usualmente vedada com ramos espinhosos, para impedir a penetração de morcegos. As janellas são fechadas durante a noite e as classes mais favorecidas queimam uma lamparina feita de uma taça de oleo de côco, onde fluctúa nagua um pavio, para evitar incendio. Os colonos pobres despresam essa precaução.

Um logar de predilecção para picada do morcego é o pé, talvez porque durante o somno o morcego é ahi menos incommodado pelos movimentos, como os da respiração. A dentada é seguida de profusa hemorrhagia, mas a victima parece que nada sente, ou antes experimenta uma sensação agradavel e acariciante!

II — ESTUDO DO MORCEGO.

A direcção que esses trabalhos deram ao problema mostraram o interesse do estudo do morcego, que deve concorrer para clarear totalmente o assumpto. Vamos passar em revista os dados mais importantes.

Classificação. Para se realisarem experiencias nesse assumpto e para se organizar o combate aos morcegos, é necessario, antes de tudo, bem conhecel-os e distinguil-os. E' uma tarefa especialisada e que fornece motivo para enganos faceis, da parte do leigo: primeiramente as especies frugivoras e insectivoras são muito numerosas, somando cerca de mil; em segundo logar, porque sempre acontece realisar-se a captura de especies frugivoras, encontradas nos fôrros das casas velhas ou abandonadas, de localidades do interior.

As especies hematóphagas da America tropical constituem a familia *Desmodontidae*, incluida outrora na familia *Phyllostomidae*. Em 1839, Waterhouse separa os *Desmodontidae* em um grupo a parte, o que é acceito geralmente. E' aos trabalhos de QUEIROZ LIMA e S. TORRES que recorremos para reunir os dados essenciaes.

A determinação dos *Desmodontidae* é baseada nos seguintes caracteres:

a) Premaxillares fundidos com os ossos visinhos.
b) Ischios não unidos por baixo da extremidade posterior do sacro.
c) Tibia muito fina, não constituida essencialmente para resistencia da perna longa e delgada.

d) Ossificação da terceira phalange do dedo medio.
e) Caninos largos, em forma de alfanje, mollares muito reduzidos, sem traço de superficie triturante.

A familia comprehende tres generos: Diphylla, SPIX (1923); Desmodus, WIED (1824) e Diaemus, MILLER (1904). Cada um desses generos é representado por uma unica especie, *Diphylla ecaudata*, SPIX, *Desmodus rotundus*, GEOFFROY e *Diaemus Youngi*, JENTINK.

A seguinte chave separa os tres generos:

A — Incisivos inferiores externos com 7 lobos; 4 mollares inferiores, 26 dentes *Diphylla.*

B — Incisivos inferiores externos no maximo com 2 lobos, tres mollares inferiores, 20 dentes.

a — Incisivo inferior interno bilobado, comprimento do dedo pollegar de $^1/_5$ do comprimento do terceiro dedo . . . . . *Desmodus.*

b — Incisivo inferior externo trilobado, o lobo central bem largo, os lobos lateraes pequenos, dedo pollegar com $^1/_8$ do comprimento do terceiro dedo . . . . . *Diaemus.*

Essas tres especies têm sido encontradas em differentes regiões do Brasil.

Habitat — O morcego hematóphago vive em ôcos de arvores velhas, vivas ou mortas, e de preferencia nas grandes arvores como a figueira brava, ou ainda em furnas de pedra, sahindo á noite para picar e lamber o sangue. Sua morada — *o caseiro* — está sempre manchada de fézes negras, em uma extensão mais ou menos longa. Sua mudança do caseiro se dá quando elle se vê perseguido pelas caçadas, ou quando a remoção dos animaes lhe tira o meio de alimentação. E' hematóphago estricto e morre de fome, na falta de sangue.

Captura — Pode ser feita por meio de uma rêde de malha estreita, bem adaptada em volta da entrada, deixando-se apenas um ponto solto por onde se faz penetrar uma vara destinada a espantal-os e fazel-os sahir do fundo do caseiro para o interior da rêde. A introducção de certa quantidade de fumaça para afugental-os, sem excesso, para não os matar, facilita o trabalho.

Conservação em captiveiro. Pode ser feita em um box telado, onde se mantêm os animaes fornecedores de sangue (bezerros); e em prateleiras dentro do mesmo box se collocam as caixas providas de portinholas, permittindo dar sahida aos morcegos. Essas caixas devem ser dispostas de modo que do lado de fora do box possam ser abertas, ou fechadas, no momento em que se queira provocar a entrada ou sahida dos morcegos. Antes de penetrar no box, o operador afugenta os morcegos para recolhel-os á caixa, que é fechada. Em captividade, a reproducção se faz. A alimentação em bovinos pode ser feita diariamente, a principio, e depois de dois em dois dias. Em viagem a alimentação pode ser feita em coelhos e cobaias.

Alimentação artificial. TORRES (72) se preoccupou com o problema da alimentação dos morcegos em captividade, o que facilita certos ensaios: Assim consegue resultados pelo emprego de sangue citratado a 0,3% ou oxalatado a

0,1 %. A quantidade de sangue sufficiente para manutenção diaria é do 50 cc. As seguintes formulas podem igualmente ser usadas:

1 — Clara de ovos . . . . . aa 20 grs.
Sangue desfibrinado . . . . . .
Sôro physiologico glycosado . . . . . 60 grs.

2 — Succo de carne crua carne fresca passada em machina e deixada em infusão em sôro physiologico 1 hora: 500 grs. de carne para 500 grs. de sôro, depois de expremer em um panno 30 grs.
Sangue desfibrinado . . . . . 10 »
Sôro physiologico glycosado . . . . . 60 »

Dose diaria de 20-40 cc. para cada morcego.

Lucta contra o morcego na prophylaxia da raiva. Dois seriam os processos de luta contra a raiva do meio rural, transmittida pelo morcego: luta directa contra o transmissor, e vaccinações.

Em relação ás vaccinações, já dissemos o que se sabe, em outro capitulo. Ellas estão se mostrando efficazes.

Em relação á luta contra o morcego, esta pode ser orientada pela destruição das moradas, pelo fogo e dos morcegos, pelo fogo, pelos gazes, por substancias toxicas.

A prophylaxia completa dependerá do povoamento dessas regiões; á medida que a civilização rural se installa nessas longas extensões em regimen de creação extensiva e primitiva, o homem se encarrega de destruir as condições de conservação desses animaes, nas suas moradas habituaes.

Em Matto Grosso as vaccinações foram bem recebidas e resolvem praticamente o problema, conforme QUEIROZ LIMA (46).

O mesmo autor (49) lembra a necessidade de um serviço de collecta, classificação e estudo do morcego, visando conhecer, principalmente: distribuição geographica, climas e estações preferidas, raio de vôo, reproducção, lutas entre si, migrações, pathologia, incidencia de portadores, duração de virulencia da saliva, e medidas de combate.

A raiva no morcego. TORRES e QUEIROZ LIMA (74), estudam ainda a raiva no morcego hematóphago, examinando o periodo de incubação, a evolução, os symptomas, a virulencia das glandulas salivares e do cerebro, a resistencia á infecção natural e experimental, a conservação dos portadores de virus, as lesões e o estudo do virus depois de passagem pelo morcego.

O periodo de incubação na infecção natural do morcego não foi ainda determinado: na infecção experimental por inoculação intramuscular, o periodo de incubação variou de 11 a 17 dias.

A evolução no morcego se processa num espaço de tempo comprehendido entre algumas horas e 3 dias.

A symptomatologia se manifesta pela perda de appetite, pelas perturbações de vôo, pelas paralysias do maxillar inferior e dos musculos do pescoço. A virulencia das glandulas salivares não coincide, sempre, com a do cerebro, nem vice-versa.

Os morcegos infectados natural ou experimentalmente, podem resistir á infecção, tornando-se, em seguida, portadores e eliminadores de virus; disseminam assim o virus entre os companheiros, pelas brigas frequentes no caseiro e mesmo entre as especies frugivoras. A conservação do virus entre os portadores foi verificada até 106 dias. As lesões verificadas no morcego são as de uma encephalite aguda, com presença de corpusculos de Negri. As infiltrações perivasculares de cellulas lymphocytoides são muito nitidas e extensas.

O virus originario do morcego se comporta como um virus rabico, com predominancia da forma paralytica, sendo o cão e o rato branco menos sensiveis que as outras especies como o coelho, a cobaia, a cabra, o carneiro, o cavallo e o boi.

ABSTRACT

This paper is a revision of the extensive literature of epizootic rabies of domestic animals in Brazil and other regions of the continent. The following points are examined by chapters.

I — The interest of the problem in animal pathology at the present time.

II — Epizooties among domestic and wild carnivorous and herbivorous animals. The role of the dog.

III — The epizooties of Brazil. The first disease centers: Sta. Catharina, Rio Grande do Sul, Paraná. The centers of Matto Grosso and Espirito Santo. New centers in São Paulo. The vaccinations.

IV — The diagnostic uncertainties, confusions and controversies. Aujeszky's disease and rabies. Differential diagnosis of rabies.

V — The outbreaks on the island of Trinidad and the cases of human rabies. Centers in the Argentine, in Paraguay and British Guiana.

VI — Transmission by haematophagous bats. Experimental study and study of the bat.

* * *

The first center of an outbreak of rabies of herbivorous domestic animals in Brazil, dates from 1908, in the coastal region of the State of Sta. Catharina. Other and more extensive centers appeared in the same locality during the following years until 1911, when identification was established. In other regions of the same State other centers appeared, and later on in other regions of the Country, both in the coastal region and in the interior. Other regions of the Continent were also visited by the scourge. This study assembles the scattered data on outbreaks, on their extension, on the losses they caused, on

epidemiology, on vaccinations, on the role of the dog, and examines the differential diagnosis and the question of the bats.

I — The extension of the outbreaks and the losses verified, clearly show the importance of the problem for Brazil. The difficulties of the diagnosis that appeared at various opportunities and in different localities, still show the general interest in these subjects, especially in countries like Brazil, where the disease can be confused with others of a similar symptomatology and not yet identified in Brazil. The cases of human rabies studied in Trinidad reveal the widest interest in these problems, in the realm of human and animal pathology.

The documentation here assembled due to the opportunity provided by the identification of two new centers in S. Paulo, constitutes a preliminary study for orienting the investigations with regard to these problems which the Institute aims to continue.

II — In this second part there are rapidly examined the classical data on the incidence of rabies in the dog, in the wild Carnivora, and the wild and domestic Herbivora, in which is always noted the high frequency of canine rabies and the rare occurrence of intense and wide spread epizooties among the domestic Herbivora. *In literature consequently there was not known a report of facts identical with those that, during many years, occur in different regions of Brazil. The animal mortality, attaining 2000 and even 4000 animals, in small localities, was alarming and far from what was known about it.*

This alarming aspect of the incidence of rabies is strange and exceptional because, aside from this, the dog always is responsible for the appearance of the epizooties, or the wild Carnivora may be held responsible. In Brazil the disease appeared in the form of an ascending paralysis, the aggressiveness of the attacked animals could be excluded, and the dog, or the habitual transmitters did not elucidate the facts suitably. Consequently the doubts and questioning of the diagnoses that appeared in foreign countries and that were made without a more complete knowledge of what was going on among us.

III — The national literature begins with a work by Stroppa. *He studies the center of Sta. Catharina in a long publication in which, however, it may be seen that it was the question of a disease with a nervous symptomology, with characteristics of the complex of rabies. He concludes, however, with a false diagnosis. The diagnosis of rabies is made by* Carini *in 1911.*

The epizooty was localized within a radius of 20 kilometers between the mountain ridge and the sea, in the coastal region of the State of Sta. Catharina, fronting the island of Florianopolis.

The diagnosis is based on inoculations, on the presence of Negri bodies and on the clinical aspect. The disease is there studied by Parreiras Horta *who collects an abundant clinical documentation and studies the virus in various species. Farther to the north of the first area, in Blumenau, the disease is studied in 1914-1916 by* Haupt and Rehaag. *The disease exists there in an area of 170 kilometers. Some cases of* rabies with cutaneous itching *are noted by various authors, and a revision of the literature allows the conclusion that it is not a question of Aujeszky's disease, in view of the evidence, dispersed and fragmentary, but concordant: presence of Negri bodies, duration of the disease, inoculation. We studied these cases in a paper on Aujeszky's disease. A new outbreak appeared in the same State in 1924, and was examined by* Alves de Souza, *who directly afterwards sees another center in the State of Rio Grande do Sul, in 9 municipalities.*

In the State of Paraná, with the cooperation of Freitas Lima *and* Castilho, *in 1926, we identified a small epizooty. Cases occurred with frequency in the horse and the mule, in a saw-mill at the edge of the woods, and it appears to us that the differential diagnosis with the encephalic myelites should be made with caution.*

Alves de Souza *in 1928, identifies the first central area in Matto Grosso. The antecedents of the disease make known an epizooty in dogs, in 1907-1908. In 1926, one cattle breeder alone lost 20 % of his cattle. 3385 bovines, 182 horses, 230 hogs, and 26 dogs die in three years. In the same manner as in former centers, the clinic, the glycosuria, the presence of the Negri bodies, the inoculations, the virulence of the saliva, permit a diagnosis. The epizooties of Matto Grosso are afterwards examined by* Queiroz Lima. *The zone of the disease has an extension of 220 kilometers, from east to west, and 200 kilometers from north to south. It includes a zone of prairies broken by hills, with woods localized along the banks of the rivers.*

In the coastal region of the Country there is still another extensive center, in the State of Espirito Santo, identified by H. Pereira, *since 1912.*

In S. Paulo we found recently, 1935, two centers: in Ubatuba; in the coastal region, and in Itú, in the interior. The losses there were curtailed; in the first case because of the small number of animals involved; in the second case because the diagnosis could be readily established and treatment by vaccination was immediately made. Even thus, in the second center, in a short lapse of time, about 60 cases occurred in horses and cattle. We saw three cases: One in a

bovine and two in horses, and they furnished material for experimental and histological study, the virus having been isolated from these two cases. The inoculations in the rabbit, in the guinea pig, the presence of Negri bodies, sometimes typical and in abundance, the passage in series, with typical paralysis. The clinical aspect of the natural infection presents itself with the appearance of a locomotor disturbance followed by partial and complete anterior or posterior paralysis, of difficulty in swallowing, of intestinal and vesicular paralysis, quivering of the muscles; when paralysis manifests itself the animal lies down without getting up again and agitates with frequency the members not yet paralysed.

The combat against rabies was realized in the beginning by the extermination of the canines and later on by vaccinations. These according to the data collected, constitute efficacious treatment. They have been made on a large scale in Matto Grosso, in Espirito Santo and in Sta. Catharina. Alone in Matto Grosso, in two years, under the guidance of Queiroz Lima, *100.000 animals were vaccinated.* Blanc de Freitas *and* Freitas Lima *perform vaccinations, the first in Espirito Santo and the second in Sta. Catharina. Here in S. Paulo, in Itú, we made about 1000 inoculations, using carbolized vaccines in doses of 25cc. in but one inoculation.*

Vaccination is favorably regarded in the rural districts and is readily adopted.

IV — The absence of the dog in the centers examined, the predominance of the paralytic form, the great mortality produced by the disease, were three surprising factors in the rabies epizooties in Brazil. From these arose the suggestions of a diagnostic error, the contentions and the mistakes. The first case of this kind is that of Kraus. *Receiving material from the Sta. Catharina center, he concludes that the outbreak there was due to Aujeszky's disease and not to rabies. It is possible that* Kraus *had examined a case of Aujeszky's disease in a center of rabies. Thus the facts would be explained, according right to all. This, however, seems to us hardly probable.*

Various observers of cases of rabies there referred to rabies with cutaneous itching. Among us this confusion between the two diseases was never made. The work of Kraus *is questioned in an article by* Carini. *Aside from this, the experiments in the centers with anti-rabid vaccinations, by their efficacy, showed that the causes were unquestionable. Experiments of crossed immunization were made by* Moses *and by* Torres. Kraus *himself in 1923, corrected the error and accepted the diagnostic of rabies.*

The second case is that of LECLAINCHE *who expresses surprise at the absence of the dog in the center of Rio Grande do Sul and disputes the diagnostic of* ALVES DE SOUZA. *That mistake is propagated and accepted by* REMLINGER *and* BAILLY *in 1931. In various recent works those mistakes are repeated, as in the excellent work of* LOURENS *in 1935.*

The work examines other mistakes in human cases, as well as in animal pathology: the case of KORITSCHÖNER, *is interesting because it treats of a somewhat special rabid virus, that kills a rabbit in 4-5 days. The case of* DONATIEN *and* BOSSELUT *in Algeria, and the case of* REMLINGER *and* BAILLY *with reference to a confusion between rabies and Carré's disease in the dog. There are other more recent mistakes: the case of Russia, where in the diagnosis, encephalomyelitis of the horse is established.* VICHELESSKY *and coworkers disagree with this diagnosis and associate many of those cases with rabies. The case of the island of Trinidad can yet be called to mind, where at first botulism was thought of and where the diagnostic of human and animal cases remained uncertain during a certain time.*

These cases show that the diagnosis of rabies has not always been an easy problem. The numerous rabies centers in various regions passed through a phase of uncertainties which the literature registers. A complete epidemical inquiry is always useful, a complete clinical examination that shows the peculiar characteristics of the disease, and afterwards the laboratory tests definitely clear up the doubts. In atypical cases the crossed immunity solves the problem.

V — Since 1925 a center appeared in the island of Trinidad, the largest of the Lesser Antilles, a British colony. The study analyses that center, making use of the data furnished by METIVIER, *by* HURST *and* PAWAN. *In 1929 there appeared cases of ascending paralysis in man. In 1931* HURST *finds intracellular inclusions and* FLEXNER *and* HURST *conclude that not only the human disease but also that of the bovines is rabies. The crossed immunity test is made and the virus of Trinidad is studied in monkeys and rabbits.* REMLINGER *and* BAILLY *also studied the virus.*

An identical disease exists in Paraguay these many years. Since 1928, the disease acquires a more serious character. It is studied by MIGONE, *by* ROSENBUSCH, *by* MIGONE *and* PENNA, *by* ACOSTA, *and is associated with the Brazilian epizooties. Some centers also ocurred in Argentine territory, where a chloroforized vaccine is prepared. In British Guiana one center is seen by* TORRES.

VI — The transmission by bats constitutes one of the most interesting of the recent acquisitions. As early as 1911, CARINI *gathered*

from the colonies of the region the observation that the disease of rabies was transmitted by the bats. PARREIRAS HORTA *examines a fruit eating bat for virus, without result.* HAUPT *and* REHAAG, *in 1916-17, in Sta. Catharina, study the question. Their experiments were made in the field, could not be executed with the necessary caution and permit doubts. However, some of the cases related by those authors are interesting: Thus they observed the case of a calf bitten by a bat, which became sick 28 days after the accident, with rigidness of the neck, agitating the head. In one bat, captured in the region, they found in the cerebrum intracellular inclusions stained by eosin. In one stable protected by screens, the accidental penetration of a bat determined cases of rabies, one of them 21 days after the accident.*

Those experiments were again taken up in Brazil by QUEIROZ LIMA, *by* QUEIROZ LIMA *and* SALLES, *and by* TORRES *and* QUEIROZ LIMA. *The work analyses those experiments, where the following results are substantiated: 1) the haemaphagous bats in the rabies centers are vectors of the virus and transmit the disease; 2) in its passage through the bat the virus does not suffer any alterations; 3) the naturally infected bats may become sick presenting the symptoms of paralytic rabies, with perturbation of the flight, etc.; 4) the results of the experiments show that, of the bats examined, with positive results, 5 of 7 captured were of the species D. rotundus, and one of 7 captured was of the species D. ecaudata.*

On the island of Trinidad the question of the bats is also examined since 1931. In the beginning fruit eating bats were examined. Since 1932, PAWAN *verified that the species of Desmodus are also frequent on the island and are vectors of the virus. Up to August of 1934,* PAWAN, *cited by* TORRES, *had found 21 specimens vectors of virus. In a work of 1932,* HURST *and* PAWAN *study the various human cases and incriminate the bat. The human case N.º 3 is impressible and relates to a servant who, while asleep, was bitten by a haematophagous bat, and is taken sick with paralytic rabies 27 days after the accident. The case is thoroughly studied.*

The direction which those investigations gave to the problem reveals the interest in the study of the bat. The frugivorous bats are numerous, numbering about 1000, and sometimes, may be confused with the haematophagous species. A classification is transcribed. The haematophagous species constitute the family Desmodontidae. The family includes three genera, each with but one species.

The haematophagous bat lives in the hollows of old trees, or in caverns in rocks. They may be captured by means of nets, with the help of a little smoke. They may be kept in captivity in the pre-

sence of animals that furnish blood. The feeding on bovines can be made daily in the beginning, and afterwards every two days. Torres *was successful in feeding it artificially with citrated blood at 0,3 %. The daily quantity of blood consists of 50 cc. Two formulas of rations are given.*

The combat against the bat is made by destroying their habitations by fire, by toxic substances, by gases.

Torres *and* Q. Lima *study the rabies in the bat, examining the incubation period, evolution, symptoms, virulence of the salivary glands, of the cerebrum, conservation of the vectors, lesions. The period of incubation in the experimental infection of the bat is from 11 to 17 days. The evolution is completed between several hours and 3 days. The principal symptoms are paralysis and disturbance of the flight. Resisting the infection, the bats can become vectors and eliminators of the virus. In this manner they disseminate the virus among their companions and among the frugivorous species. It was verified that the vectors preserved the virus up to 106 days. The lesions of the bat are those of an acute encephalitis, with Negri bodies.*

BIBLIOGRAPHIA

1 — Alves de Souza, M. — 1926 — Raiva em Sta. Catharina. Rev. Zoot. Vet., **12**, 27.

2 — Alves de Souza, M. — 1926 — A epizootia de Gravatahy. Rev. Zoot. Vet., **12**, 59.

3 — Alves de Souza, M. — 1927 — A raiva no Estado do Rio Grande do Sul. Rev. Zoot. Vet., **13**, 159.

4 — Alves de Souza, M. — 1929 — A raiva em bovinos no Estado de Matto Grosso. **15**, 65.

5 — Barbier, A. — 1926 — Une épizootie de rage sur le renard. Rev. Gen., **35**, 609.

6 — Bassewitz, E. — 1928 — Epizootias do Brasil austral. Raiva. Rev. Zoot. Vet., **14**, 266.

7 — Blanc de Freitas, H. — 1929 — A raiva e sua prophylaxia pela vaccinação. Rev. Zoot. e Vet., **15**, 93-99.

8 — Braga, A. — 1924 — Diagnostico de uma doença no Estado do Espirito Santo. Bol. Soc. Bras. Med. Vet., **1**, n. 1.

9 — Bruno, B. — 1931 — A epizootia de Matto Grosso. Rev. Zoot. Vet., **17**, 15-40.

10 — Bruno, B. — 1931 — A molestia do gado bovino em Matto Grosso. Rev. Zoot. Vet., **17**, 242-265.

11 — Carini, A. — 1911 — Sur une grande épizootie de rage. An. Inst. Pasteur, **25**, 843.

12 — Carini, A. — 1931 — Defendendo um diagnostico: A epizootia de Sta. Catharina era de raiva. Arch. de Biol., **14**, 224.

13 — Carneiro, V. e Freitas Lima, C. — 1927 — Estudos sobre a raiva no Paraná. Rev. Zoot. Vet., **13**, 137-156.

14 — Carneiro, V. — 1936 — Estudo sobre a doença de Aujeszky. Folha Clinica e Biologica, n.º 6.

15 — Donatien, A. — 1925 — Les maladies microbiennes des animaux domestiques en Algérie. Rev. Gen. Med. Vet., **34**, 65.

16 — Donatien, et Bosselut — 1922 — Rev. Gen. Med. Vet., **26**, 185.
17 — Franco de Faria — 1929 — A raiva nos rebanhos do municipio de Rosario Oeste. Bol. Soc. Bras. Med. Vet., Ano 5.
18 — Freitas Lima, C. — 1934 — A raiva em Sta. Catharina. Rev. Dep. Nac. Prod. Anim., **1**, 41.
19 — Freitas Lima C., Carneiro, V. e Castilho, A. — 1926 — Diagnostico differencial da raiva. Rev. Zoot. Vet., **12**, 37.
20 — Fröhner y Zwick — 1926 — Patologia y Terapeutica Veterinarias. **2**, 480.
21 — Haupt, H. e Rehaag, H. — 1921 — Durch Fledermäuse verbreitete seuchenhafte Tollwut unter Viehbeständen in Sta. Catharina. Zeitsch. f. Infekt. der Haustiere. **22**, 76.
22 — Haupt, H. e Rehaag, H. — 1921 — Idem, idem, **22**, 104.
23 — Haupt, H. e Rehaag, H. — 1924 — Raiva epizootica nos rebanhos de Sta. Catharina, transmittida por morcegos. Bol. Soc. Bras. Med. Vet., Ano 1, n. 12.
24 — Haupt, H. e Rehaag, H. — 1925 — Idem, idem, Ano 2, ns. 1-2.
25 — Henning, M. W. — 1932 — Animal Diseases in South Africa. Rabies. **2**, 597-618.
26 — Hurst, E. W. et Pawan, J. L. — 1931 — Une épidemie de rage á la Trinité, sans morsures et avec les symptomes d'une myélite aigüe ascendante. The Lancet, **221**, 622. An. Rev. Gen. Med. Vet., **42**, 27.
27 — Hurst, E. W. and Pawan, J. L. — 1932 — A further account of the Trinidad outbreak of acute rabies myelites: histology of the experimental disease. J. of Path. and Bact., **35**, 301.
28 — Kraus, R. und Duran, A. — 1932 — Ueber die in Südamerika vorkommenden Epidemien der Hundswut bei Rindern und Pferden (Mauleseln). Zeitsch. f. Immun., **74**, 182.
29 — Kraus, Gerlach und Schweinburg — 1926 — Lyssa bei Mensch und Tier, p. 115.
30 — Leclainche, E. — 1928 — La rage à l'Etat du Rio Grande do Sul. Rev. Gen. Med. Vet., **37**, 150.
31 — Leclainche, E. — 1935 — La situation sanitaire en 1934. Bull. Off. Epizooties, **10**, 11-12.
32 — Ligniéres, J. — 1933 — Bulletin de l'Academie Vétérinaire de France. **6**, 178.
33 — Lourens, E. — 1935 — La maladie d'Aujeszky. Bull. Off. Épiz., **10**, 199-240.
34 — Metivier, M. — 1935 — Paralytic rabies in livestock. J. Comp. Path. Th., **48**, 245.
35 — Migone, L. E. y Peña, R. — 1933 — El mal de caderas de los bovinos del Paraguay. Rev. Zoot., Ano **20**, n. 223, p. 37.
36 — Moses, A. e demais membros da commissão — 1931 — Parecer da commissão sobre o trabalho de S. Torres, relativo ao preparo da vaccina antirabica. Rev. Zoot. Vet., **17**, 135.
37 — Moussu R. — 1926 — Affections enzootiques du sist. nerveux central des animaux domestiques. (Thèse) Paris.
38 — Nicolau, S. Mathis, C. Constantinesco, Mme. V. — 1933 — La rage autochtone (maladie du chien fou) en Afrique Occ. Française. Ann. Inst. Pasteur, **50**, 778.
39 — Nicolle, Ch. — 1930 — C. R. Ac. Sc., **191**. (Note de Rosenbusch).
40 — Nocar, E. et Leclainche, E. — 1903 — Les maladies microbiennes des animaux domestiques.
41 — Oreste — 1910 — Enfermedades infecciosas de los animales. Madrid.

42 — Parreiras Horta, P. — 1911 — A epizootia de Biguassú. Rev. Zoot. Vet., **1**, 5.
43 — Parreiras Horta, P. — 1911 — A epizootia de Biguassú. Rev. Zoot. Vet., **1**, 135.
44 — Peña — 1931 — O mal de caderas dos bovideos do Paraguay é raiva. Arch. de Biol. **15**, n. 164.
45 — Pereira, H. — 1917 — Raiva. Rev. Zoot. Vet., **7**, 26.
46 — Queiroz Lima, E. — 1932 — Relatorio da Comissão de Profilaxia da Raiva em Mato Grosso em 1931. Rev. Zoot. Vet. **18**, 20.
47 — Queiroz Lima, E. — 1934 — Brasil Medico, 20 de Janeiro, **3**, 38.
48 — Queiroz Lima, E. — 1934 — A transmissão da raiva dos herbivoros pelos morcegos hetophagos da familia Desmodontidae. Rev. Dep. Nac. Prod. Anim., **1**, 165.
49 — Queiroz Lima, E. — 1935 — Novos rumos na epizootia e na prophylaxia da raiva dos herbivoros. Bol. Minist. Agric., **24**, 109.
50 — Queiroz Lima, E. e Salles, A. — 1933 — Jornal do Commercio, 10 de Setembro.
51 — Remlinger, P. — 1935 — La rage dite de laboratoire. An. Inst. Pasteur. Supplmt. n.º comm. sur la rage. Outubro 25.
52 — Remlinger, P. et Bailly, J. — 1931 — Les confusions entre les v. neutrotropes et le v. rabique. Bull. Inst. Pasteur, **29**, 1.
53 — Remlinger, P. et Bailly, J. — 1931 — Identité du mal de caderas bovin et de la rage. Bull. Acad. Méd., **104**, 71 (An. Bull. Inst. Pasteur. **30**, 296).
54 — Remlinger, P. et Bailly J. — 1931 — Etudes sur la rage. An. Inst. Pasteur, **47**, 643.
55 — Remlinger, P. et Bailly, J. — 1932 — Contribution à l'etude du virus de la Trinité. Bull. Ac. Méd., **107**, 242, An. Bull. Inst. Past., **30**, 835.
56 — Rocha, A. — 1913 — Profilaxia antirabica em Sta. Catharina. Rev. Zoot. Vet., **3**, n. 5.
57 — Rosenbusch, F. — 1930 — Sur une maladie des bovins du Paraguay voisine de la rage paralytique. C. R. Acad. Sciences, P. 967, 17 novemb. An. Rev. Gen. Med. Vet., **40**, 480.
58 — Rosenbusch, F. — 1931 — Observaciones experimentales, histopatologica y etiologicas del mal de caderas de los bovinos en el Paraguay. An. de la Soc. Rural Argentina, **65**, 51.
59 — Rossas, J. F. — 1917 — Contribuição para o estudo da epizootia reinante no Estado do Espirito Santo. Rev. Zoot. Vet., **7**, 46.
60 — Salles A. — 1935 — Notas sobre o problema da transmissão da raiva bovina. O Campo, **6**, 53.
61 — Salles, A. — 1935 — Notas sobre o problema da transmissão da raiva bovina. O Campo, **6**, 63
62 — Stroppa, C, — 1911 — Relatorio ao Governo do Estado de Sta. Catharina.
63 — Torres S. — 1927 — Vacinação antirabica dos animaes domesticos. Rev. Zoot. Vet., **13**, 107.
64 — Torres, S. — 1928 — Vacinação antirabica preventiva de bovinos. Rev. Zoot. Vet., **14**, 71.
65 — Torres, S. — 1931 — Technica para preparo de vacina antirabica para uso animal. Rev. Zoot. Vet., **17**, 129.
66 — Torres, S. — 1931 — A raiva no Brasil. Seu diagnostico pela fixação da alexina. Rev. Zoot. Vet., **17**, 148.
67 — Torres, S. — 1931 — A raiva no Brasil. Rev. Zoot. Vet., **17**, 266.

68 — TORRES, S. — 1931 — Verificações sobre a imunidade cruzada. Rev. Zoot. Vet., **17**, 266.
69 — TORRES, S. — 1934 — Doenças dos animaes no alto Rio Doce. Rev. Dep. Nac. Produc. Animal, **1**, 273.
70 — TORRES, S. — 1934 — Morcegos da familia Desmondotidae e seu papel na transmissão das doenças dos animaes. Rev. Dep. Nac. Prod. Anim., **1**, 25.
71 — TORRES, S. — 1935 — Os morcegos hematofagos. Bol. Minist. Agric., **24**, 139.
72 — TORRES, S. — 1936 — Alimentação de morcegos hematofagos em captiveiro. Folha Veterinaria, **1**, 49.
73 — TORRES, S. e QUEIROZ LIMA, E. — 1935 — A raiva e sua transmissão por morcegos hematofagos infectados naturalmente. Rev. Dep. Nac. Produc. Anim., **11**, 1.
74 — TORRES, S. e QUEIROZ LIMA, E. — 1935 — A raiva nos morcegos hematofagos. Rev. Dep. Nac. Produc. Animal. **2**, 385.
75 — VERGE, J. — 1933 — Rev. Gen. Méd. Vet., **42**, 27.
76 — VICHELESKY, R., NASKOV, A., SOUKHOF et MOUTOVINE, V. — 1935 — Meningo-encéphalo-myelite infectieuse du cheval en U. R. S. S. Rec. Med. Vet., **111**, 357.
77 — VICHELESKY, R.. NASKOV, A., SOUKHOF et MOUTOVINE, V. — 1936 — La rage en Tchécoslovaquie. Bull. Of. Épiz., **12**, 485.
78 — VICHELESKY, R., NASKOV, A., SOUKHOF et MOUTOVINE, V. — 1936 — La rage en Yougoslavie. Bul. Of. Épiz., **12**, 486.

———o———

ERRATA

	em vez de	leia-se
p. 20 11.ª linha a partir de baixo	*margine crenata*	*margine dentata*